

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biitekniikka

2012

Kochar Mahmoodi

VASTA-AINEIDEN TOIMIVUUDEN TESTAUS WESTERN BLOT- MENETELMÄLLÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Kochar Mahmoodi

VASTA-AINEIDEN TOIMIVUUDEN TESTAUS WESTERN BLOT- MENETELMÄLLÄ

Opinnäytetyö tehtiin VTT:n lääkekehityksen biotekniikan Turun yksikössä. Työn päämääränä oli testata valmiiden seerumivasta-aineiden toimivuutta. Työssä testatut vasta-aineet tuotettiin osana Epiatron EU-projektia.

VTT:n lääketieteellisen biotekniikan laboratoriossa aikaisemmin tehtyjen eturauhasen syöpään liittyvien tutkimuksien yhteydessä valittiin jatkotutkimuksiin 12 potentiaalista uutta lääkehoidonkohdetta ja merkkiainetta. Geenien toiminnan ja ilmentymisen tutkimiseksi eturauhassyöpäsoluissa sekä eturauhaskudoksessa tarvittiin kyseisten geenien proteiinituotteille toimivat vasta-aineet. Proteiineille tilattiin vasta-aineiden valmistus kaneissa Epiatron EU-projektin avulla. Tässä opinnäytetyössä tutkittiin tuotettuja vasta-aineita sisältävien seeruminäytteiden toimivuutta antigeenin tunnistuksessa käyttäen Western-blot menetelmää.

Western- blot on menetelmä, jossa erilaiset molekyylit, tässä tapauksessa proteiinit, erotellaan ensin kokonsa mukaisesti sähkökentässä. Erotus tapahtuu SDS-PAGE (eng. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)-elektroforeesilla. Geelissä kokonsa mukaan ajautuneet proteiinit siirretään Transfer-ajossa sähkökentässä nitroselluloosakalvolle, jonka jälkeen voidaan kalvolla oleviin proteiineihin sitouttaa kullekin proteiinille spesifinen vasta-aine. Proteiinit ja niihin sitoutuneet vasta-aineet saadaan tämän jälkeen näkyviin HRP-leimatun (piparjuuri-peroksidaasientsyymi engl. horseradish peroxidase) sekundaarisen vasta-aineen avulla, jolloin proteiinien ja niihin sitoutuneiden vasta-aineiden sijainti saadaan näkyviin röntgenfilmmissä. Proteiinien visualisointiin käytettiin ECL Western blotting detection-reagenssia.

Osa työssä testatuista 22 vasta-aineita sisältävistä kanin seeruminäytteistä sitoutui epäspesifisesti muihin kuin kohdeproteiineihin ja osassa signaalia ei saatu näkymään. Kahdestatoista proteiinista neljälle löytyi mahdollisesti toimiva vasta-aine jatkotutkimuksia varten.

ASIASANAT:

Western blot, vasta-aine, seerumi, proteiini.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

Summer 2012 | 52 pages

Instructors: Kristiina Iljin, Docent ; Paula Vainio, D.Med.Sc. ; Ilari Suominen, Ph.D.

Kochar Mahmoodi

ANTIBODY TESTING BY WESTERN BLOT

The aim of this study was to test the functionality of ready-made serum antibodies. The experimental part of the project was executed in the Medical Biotechnology unit of VTT Technical Research Center of Finland in Turku. The antibodies used in this project were obtained via the Epitron EU project.

In order to study the function of genes and their expression in tissues, the availability of functional antibodies for the protein products genes should be ensured. In this study, antibodies generated against twelve potential prostate cancer relevant proteins were validated. The rabbit serum samples containing the antibodies were obtained via Epitron EU project. In this study, antibodies were tested using the Western blot method.

The Western blot is a method where different molecules, proteins in this case, are separated in an electric field by their size (molecular weight). The separation is achieved by SDS-PAGE electrophoresis (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Subsequently, the proteins are transferred onto a nitrocellulose membrane. In the present study the proteins recognized by the antibodies present in the rabbit serum samples were detected and visualized on X-ray film using an HRP (horseradish peroxidase) labeled secondary antibody and an ECL Western blot detection reagent.

In total, 22 serum samples from immunized rabbits were tested. In some samples, the antibodies were non-specific, whereas in others, no signal was detected. Functioning antibodies were detected for four out of the 12 target proteins.

KEYWORDS:

Western blot, antibody, serum, protein

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	6
1 ETURAUHASSYÖPÄ	7
1.1 Yleisyys	8
1.2 Syntymekanismi	8
1.3 Diagnostiikka	8
1.4 Hoitomenetelmät ja oireet	11
2 TYÖN TARKOITUS	13
3 VASTA-AINEIDEN TUOTTO JA SEERUMIT	14
3.1 Valitut geenit ja peptidit	15
3.2 Tuotto kaneissa	16
3.2.1 Seerumit	18
4 TESTAUSMENETELMÄT JA TYÖN SUORITUS	20
4.1 Solulinjat	20
4.2 Western blot	21
4.3 Laitteet ja välineet	22
4.4 Reagenssit	23
4.5 Työn suoritus	25
5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	31
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	44
LÄHTEET	46

LIITTEET

Liite 1. Vasta-aineiden infotaulukko
Liite 2. Reagenssien tiedot

KUVIOT

Kuvio 1. Miesten uusien syöpätapauksien lukumäärä, mennyt ja ennustettu trendi.	10
Kuvio 2. Polyklonaalisen vasta-aineen tuotto kanissa.	18
Kuvio 3. Western blot.	22
Kuvio 4. Vasta-aineiden toimintaperiaate.	29
Kuvio 5. Kaupallinen proteiinibiomarkkeri standardi (Bio-Rad).	31
Kuvio 6. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina ERG.	32
Kuvio 7. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina FAM110B.	33
Kuvio 8. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina ELOVL2.	34
Kuvio 9. Vasta-aineiden testaus, kohdeproteiinina ELOVL5.	35
Kuvio 10. Vasta-aineiden testaus, kohdeproteiinina ARG2.	36
Kuvio 11. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina TRIB1.	37
Kuvio 12. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina TPX2.	38
Kuvio 13. Vasta-aineiden testaus, kohdeproteiinina IHH.	39
Kuvio 15. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina ORM1.	41
Kuvio 16. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina TMED3.	42
Kuvio 17. Vasta-aineiden testaus, kohdeproteiinina RAD21.	43

TAULUKOT

Taulukko 1. Eturauhassyövän tapausmäärät vuosina 1963–2009.	7
Taulukko 2. Veren normaalit PSA- arvot ikäluokittain.	9
Taulukko 3. Syöpien luokittelu WHO:n määrittelyn mukaan.	11
Taulukko 4. Proteiini-kohtaiset vasta-aineet ja niiden peptidit.	16
Taulukko 5. Solulinjojen geenikohtaiset mRNA:n ilmentymistasot.	20
Taulukko 6. Ensimmäisten vasta-aineiden tiedot	23
Taulukko 7. 10-kuoppaisen kaupallisen geelin (LONZA) täyttäminen.	25

KÄYTETYT LYHENTEET

ECL	Enhanced chemiluminescent reaction
Epitron	Epigenetic Treatment Of Neoplastic disease
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobuliini
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline + 0, 1 % TWEEN 20
TWEEN 20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, POLYSORBATE 20

1 ETURAUHASSYÖPÄ

Suomessa eturauhasen syöpä on miesten yleisin syöpä. Suomen syöpärekisterin mukaan eturauhassyöpää sairasti vuonna 2009, 4595 miestä, ja eturauhassyövän aiheuttamia kuolemantapauksia oli 783 kappaletta. Taulukossa 1 on esitetty eturauhassyövän tapauskohtaiset määrät vuosina 1963–2009. (Suomen syöpärekisteri 2011 [viitattu 19.1.2012].)

Taulukko 1. Eturauhassyövän tapausmäärät vuosina 1963–2009 (Suomen syöpärekisteri 2011 [viitattu 19.1.2012], taulukkoa muokattu).

Vuosi	1963-1967	1968-1972	1973-1977	1978-1982	1983-1987	1988-1992	1993-1997	1998-2002	2003-2007	2008	2009
Eturauhasen syöpään sairastuneet	375	578	751	1003	1190	1463	2430	3481	4732	4217	4595

Eturauhassyövän syntymekanismi on vielä suurelta osin epäselvä. Eturauhassyövän etenemisestä, hoidosta, seulonnasta ja ennusteesta ei olla samaa mieltä, koska tutkimustulokset ovat ristiriitaisia. Tämän takia on vaikeaa tietää tarkalleen miten eturauhassyöpä on syntynyt ja miten se etenee eri tapauksissa. Kuitenkin on selvää, että miessukupuoli-hormoni edesauttaa eturauhassyövän syntyä ja kasvua. (Suomalainen eturauhassyöpä 2007 [viitattu 26.12.2011]; Duodecim terveystietokirjasto, 2007 [viitattu 26.12.2011].)

Eturauhassyövän syntymekanismien ja siinä tapahtuvien geeniekspressiotasojen muutosten tutkiminen auttaa muun muassa löytämään parempia ja spesifisempiä merkkiaineita tietyn tyyppisten eturauhassyöpätapauksien diagnostiikkaan ja saattaa edesauttaa myös parempien potilas- tai tuumorikohtaisten hoitojen kehittämisessä.

Tässä opinnäytetyössä pyrittiin löytämään valituille eturauhassyöpään aiemmin liitetuille merkkiaineille toimivat vasta-aineet jatkotutkimuksia varten.

1.1 Yleisyys

Yleisin syöpä suomalaisilla miehillä on eturauhassyöpä. Noin yksi kymmenestä miehestä sairastuu tähän tautiin elämänsä aikana (Joensuu ym. 2007, 434). Eturauhassyöpä voidaan havaita veren prostataspesifisen antigeenin (PSA) pitoisuutta mittaamalla. (Joensuu ym. 2007, 434; Suomen syöpärekisteri 2011 [viitattu 19.1.2012].)

1.2 Syntymekanismi

Eturauhassyövän syntymekanismi on edelleen epäselvä, mutta sen tiedetään liittyvän muun muassa miessukupuolihormonin toimintaan. Eturauhasen syövässä on kuvattu myös yleinen geenifuusio, joka johtaa ERG-syöpägeenin tuottoon eturauhasen epiteelisoluissa, joissa sitä ei normaalisti tuoteta ja täten edesauttaa eturauhassyövän synnyssä. (Duodecim terveyskirjasto 2007 [viitattu 26.12.2011].)

1.3 Diagnostiikka

Eturauhassyövän primäärisiin diagnostisiin menetelmiin kuuluu eturauhasen tunnistelu ja laboratoriokokeiden otto (veren PSA- pitoisuuden määrittäminen). Näiden testien jälkeen tehdään tarvittaessa transrektaalinen ultraäänitutkimus, jonka avulla voidaan määrittää otettavaksi koepala oikeasta kohdasta eturauhasta. Tutkimusten jälkeen päätetään eturauhassyövän koon ja levinneisyyden (taulukko 3) mukaan, oikeat toimenpiteet ja hoidot. (Joensuu ym. 2007, 435–446.)

PSA- määrittäminen lisääntyessä 1990 luvun alusta lähtien, eturauhassyöpää sairastavien miesten lukumäärä lisääntyi merkittävästi. PSA- määrittäminen yleistyksen lisäksi syynä voi olla myös diagnostisten menetelmien kehittyminen. (Tampereen yliopisto 2011 [viitattu 24.12.2011].)

Veren PSA arvot nousevat iän mukana, joten ei ole kaikille ikäryhmille pätevää PSA viitearvoa, vaan PSA- viitearvot luokitellaan iän mukaan. Normaalista PSA-

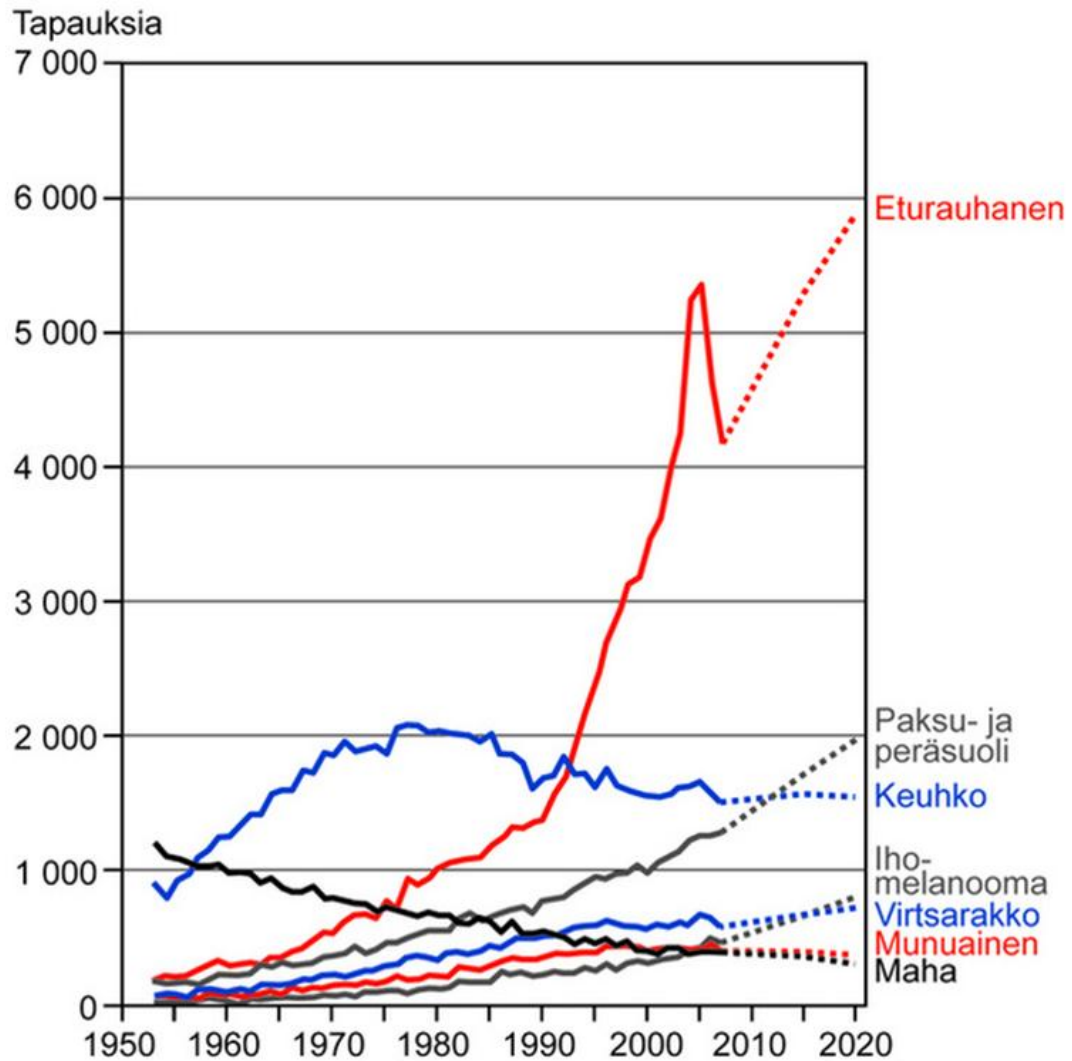
arvon pitää olla alle 4 µg/l. Iän karttuessa prostataspesifistä antigeeniä erittyy kuitenkin enemmän vereen. Eturauhassyövän viitearvona pidetään 10 µg/l. Taulukossa 2 on esitetty veren normaalit PSA- arvot ikäluokittain. (Joensuu ym. 2007, 436, [viitattu 3.9.2011]; Duodecim terveyskirjasto 2008 [viitattu 24.12.2011].)

Taulukko 2. Veren normaalit PSA- arvot ikäluokittain (Joensuu ym. 2007, 436, [viitattu 3.9.2011]).

IKÄ	PSA- arvot (µg/l)
40-49	2,5
50-59	alle 3,5
60-69	alle 4,5
70-79	alle 6,5

Kyseessä ei kuitenkaan välttämättä ole syöpä, vaikka PSA arvot ylittävät normaalit viitearvot, sillä PSA- tasot saattavat kohota myös eturauhasen epiteelin hyvänlaatuisen liikakasvun seurauksena. (Syöpäjärjestöt 2009 [viitattu 19.1.2012].)

Diagnostisten menetelmien kehittymisen johdosta viimeisten vuosikymmenten aikana eturauhassyöpätapauksien määrä on kasvanut merkittävästi. Kuviossa 1 on esitetty graafisesti uusien syöpätapauksien lukumäärä (mennyt ja tuleva aika). (Joensuu ym. 2007, 436; Suomen syöpärekisteri 2009 [viitattu 19.1.2012].)



Kuvio 1. Miesten uusien syöpätapauksien lukumäärä, mennyt ja ennustettu trendi (Suomen syöpärekisteri 2009 [viitattu 19.1.2012]).

Todettujen eturauhassyöpätapausten määrä nousee vuosi vuodelta. Syitä tähän on eliniän nousu, perinnöllisyys, huonot elintavat kuten tupakointi, lihan ja rasvan runsas kulutus sekä joidenkin vitamiinien puute (Joensuu ym. 2007, 434–435).

Nykyisten diagnostisten testien tuloksia ei voi käyttää potilaskohtaisten hoitomenetelmien suunnittelussa ja eturauhassyövän hoitoa ei olekaan vielä räätälöity tapauskohtaisesti. Jotta henkilökohtainen hoito olisi tulevaisuudessa mahdollista, on löydettävä uusia merkkiaineita ja hoitokohteita tapauskohtaisesti.

Tällöin saadaan aikaiseksi paremmat ja spesifisemmät potilas ja tuumorikohtaiset hoidot.

PSA:n lisäksi eturauhassyövän diagnostiikkaan tarvitaan uusia eturauhassyöpäspesifisempiä merkkiaineita. On olemassa jo tutkimusraportteja, joissa on pystytty määrittämään virtsanäytteestä ERG- onkogeenin esiintyvyys, mikä viittaa spesifisesti eturauhassyöpätapauksiin ja auttaa näin diagnosoinnissa (Duodecim terveyskirjasto 2007 [viitattu 26.12.2011]).

1.4 Hoitomenetelmät ja oireet

Eturauhassyöpä luokitellaan WHO:n (World Health Organisation) määrittämään kolmijaon gradus 1, gradus 2 ja gradus 3 mukaisesti. Taulukossa 3 on esitetty WHO:n määrittämä syöpien luokitus. (Joensuu ym. 2007, 435.)

Taulukko 3. Syöpien luokittelu WHO:n määrittäksen mukaan (Joensuu ym. 2007, 435).

Luokittelu	Määritelmä
gradus 1	hyvin erilaistunut
gradus 2	kohtalaisesti erilaistunut
gradus 3	huonosti erilaistunut tai erilaistumaton

WHO:n määrittämän luokituksen lisäksi on Gleasonin luokitus, jossa luokitus määräytyy erilaistumisasteen mukaan yhdestä viiteen. Solutyyppi joka kasvaa hitaasti on luokiteltu asteeseen 1, ja solutyyppi joka on asteeltaan 5 on nopeasti kasvava ja erilaistuva. (Syöpäjärjestöt 2005 [viitattu 19.1.2012].)

Eturauhassyöpää varhaisessa vaiheessa sairastava ei välttämättä edes tiedä sairastavansa syöpää, koska oireita ei välttämättä esiinny.

Eturauhassyövän aiheuttamia oireita ovat muun muassa virtsaamisvaivat, laihtuminen, anemia, luustokivut sekä muut yleiset syövän oireet (Joensuu ym. 2007, 436).

Eturauhassyöpään käytettyjä hoitoja ovat mm. seuranta, leikkaus, sädehoito, hormonihoito, solunsalpaajat sekä oireita lieventävät hoidot (Syöpäjärjestöt 2005 [viitattu 19.1.2012]).

Hoidon määrää, syöpäkudoksen erilaistumisaste, syövän leviämisen aste, potilaan ikä sekä potilaan kunto. Lääkärin pitää myös ottaa huomioon potilaan oma mielipide hoidosta. (Syöpäjärjestöt 2005 [viitattu 19.1.2012].)

2 TYÖN TARKOITUS

Työn tarkoitus oli testata ja analysoida valituille mahdollisille uusille eturauhassyövän merkkiaineille ja hoidonkohteille kaneissa tuotettuja vasta-aineita. Geenien toiminnan ja ilmentymisen tutkimiseksi eturauhassyöpäsoluissa sekä eturauhaskudoksessa tarvittiin kyseisten geenien proteiinituotteet tunnistavat vasta-aineet.

Työssä testatut vasta-aineet saatiin Epitron EU-projektista (EPIgenetic TRreatment Of Neoplastic disease). Vasta-aineet oli teetetty yhteensä 12 antigeenille ja tässä työssä tutkittiin yhteensä 22 kappaletta seeruminäytteitä ko. kohteille.

Epitron oli Euroopan unionin 6. puiteohjelman (LSHC-CT-2005–518417)-rahoittama projekti, jonka tarkoituksena oli tutkia epigeneettisiä muutoksia syövässä. Projektissa oli mukana seitsemän EU-jäsen maata, joista yksi oli Suomi. (The EPITRON Project 2006 [viitattu 19.1.2012].)

Työssä tutkittiin vasta-aineiden toimivuutta käyttäen Western blot menetelmää. Western blot on menetelmänä melko yksinkertainen. Siinä erikokoiset proteiinit erotellaan sähkökentässä SDS-PAGE (eng. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)- elektroforeesilla, jolloin proteiinit liikkuvat positiivisesti varautunutta elektrodia kohti, kokonsa perusteella määräytyvällä nopeudella. Tämän jälkeen proteiinit siirretään sähkökentässä nitroselluloosakalvolle ja leimataan vasta-aineiden avulla. Lopuksi näytteet visualisoidaan röntgenfilmiä ja ECL Western blotting detection- reagenttia (Amersham, GE Healthcare) käyttäen.

3 VASTA-AINEIDEN TUOTTO JA SEERUMIT

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit kuuluvat selkärankaisten immuunijärjestelmään. Nämä immunoglobuliinit koostuvat viidestä isotyypistä muun muassa IgG:stä (yleisin), IgA:sta, IgM:stä, IgE:stä ja IgD:stä. (Solunetti 2006 [viitattu 21.8.2011]; Suominen, 2010, 23 [viitattu 9.7.2011]; Hedman ym. 2011,101.)

Immunoglobuliinit, jotka ovat glykoproteiineja, auttavat elimistöä osallistumaan ja tuhoamaan elimistöön tulleita infektioita aiheuttavia, vieraita aineita ja mikrobeja. Immuunijärjestelmään kuuluvat glykoproteiinit esiintyvät seerumissa ja kudoksneesteissä. (Suominen 2010, 8, 20 [viitattu 9.7.2011]; Hedman ym. 2011,101–102.)

Vasta-aineita tuottavat B-lymfosyytit eli B-solut kypsyvät luuytimessä. Osa B-soluista muuttuu plasmasoluiksi ja osa muistisoluiksi. Plasmasoluiksi kypsyneet solut tuottavat vasta-aineita, jotka taistelevat infektiota vastaan. B-solun muistisolut voivat tuottaa lisää muistisoluja tai voivat nopeasti muuntua efektorisoluiksi, kun solu toisen kerran altistuu samalle antigeenille. Näin puolustautuminen on tehokkaampaa ja nopeampaa ja patogeeni saadaan nopeasti eliminoitua. (Solunetti 2006 [viitattu 21.8.2011]; Suominen 2010,18 [viitattu 9.7.2011]; Hedman ym. 2011,130–133; MedicineNet.com 2011 [viitattu 22.8.2011];

B-solun tuottamat vasta-aineet kiinnittyvät B-solun solukalvolle. Niiden tehtävänä on toimia antigeenireseptoreina. B-solu aktivoituu kun solu toisen kerran altistuu samalle aikaisemmin ilmentyneelle antigeenille. Tätä sekundaarista toissijasta immuunivastetta kutsutaan adaptiiviseksi immuunivasteeksi. B-solun aktivaatio ei voi tapahtua itsessään, vaan se tarvitsee T-auttajasolujen aktivoitumista. (Solunetti 2006 [viitattu 21.8.2011]; Suominen 2010,18, 21 [viitattu 9.7.2011])

Kun vieras bakteeri pääsee elimistöön auttaja- T-solu tunnistaa tämän bakteerin antigeenit, jolloin T-auttaja solu alkaa erittää sytokiineja. Sytokiini toimii tässä

tapauksessa T-auttaja-solun ja B-solun välisenä välittäjäaineena, joka viestii sen, että B-solun pitäisi alkaa tekemään vasta-aineita esimerkiksi viruksen anti-geeniä vastaan. (Suominen 2010, 75 [viitattu 8.5.2011]; Suominen 2011,15,21, 51 [viitattu 9.7.2011])

Tässä opinnäytetyössä tutkitut vasta-aineet oli valmistettu kaneissa Eptron EU-projektissa. Vasta-aineet olivat polyklonaalista. Polyklonaaliset vasta-aineet ovat joukko eri B-solulinjoissa tuotettuja immunoglobuliineja, jotka tunnistavat halutun antigeenin (Switzer & Garrity 1999, 267). Kuviossa 2 on esitetty vasta-aineiden tuotto kanissa.

3.1 Valitut geenit ja peptidit

Opinnäytetyössä tutkittiin 22 seeruminäytettä, joiden kyky tunnistaa kohdeproteiini selvitettiin.

Testauksissa käytettiin vasta-aineiden valmistajalta saatua vasta-aineiden info-taulukkoa (liite 1), jossa on listattu seeruminäytteistä käytetyt tunnisteteet sekä kanien immunisoinnissa käytetyt kohdeproteiinit. Geenien ilmentyminen solulinjoissa, joista työtä varten tehtiin proteiinilysaatit, oli varmistettu aiemmin koko genomien kattavilla lähetti-RNA:n profiloinneilla.

Jokaiselle kohdeproteiinille (paitsi ORM1:lle) oli immunisoinneissa käytetty kah- ta eri peptidiä (joko A- tai ja B- peptidiä tai niiden sekoitusta, mix). A-peptidi edustaa geenisekvenssissä N-terminaali-päätä (N-terminus) ja B-peptidi edustaa geenisekvenssissä C-terminaali-päätä (C-terminus). Taulukossa 4 on esitetty kohdeproteiineihin testatut vasta-aineet, ja niiden valmistamiseen käytetyt pep- tidit.

Taulukko 4. Proteiini-kohtaiset vasta-aineet ja niiden peptidit

Vasta-aine	Peptidi	Kohdeproteiini
#EP27	#EP27A - 64605	ERG
#EP30	#EP30A – 64611	FAM110B
#EP31	#EP31A - 64613	ELOVL2
#EP71	#EP71A ja #EP71B (mix)	ELOVL5
#EP72	#EP72A ja #EP72B (mix)	ARG2
#EP73	#EP73A ja #EP73B (mix)	TRIB1
#EP74	#EP74A ja #EP74B (mix)	TPX2
#EP76	#EP76A ja #EP76B (mix)	IHH
#EP77	#EP77A ja #EP77B (mix)	CYP4F8
#EP82	#EP82	ORM1
#EP83	#EP83A ja #EP83B (mix)	TMED3
#EP84	#EP84A ja #EP84B (mix)	RAD21

3.2 Tuotto kaneissa

Tässä opinnäytetyössä testatut polyklonaaliset vasta-aineet oli valmistettu kaneissa. Polyklonaaliset vasta-aineet ovat joukko eri B-solulinjoissa tuotettuja immunoglobuliineja, jotka tunnistavat halutun antigeenin. Vasta-aineet sitoutuvat saman antigeenin eri epitooppeihin. (Switzer & Garrity 1999, 267.)

Vasta-aineiden tuotto voidaan tehdä myös toista menetelmää käyttäen, jota kutsutaan monoklonaalisten vasta-aineiden tuotoksi. Monoklonaaliset vasta-aineet ovat peräisin yhdestä B-solulinjasta ja ne tunnistavat ja sitoutuvat vain yhteen tiettyyn epitooppiin. (Switzer & Garrity 1999, 267.)

Menetelmänä monoklonaalisten vasta-aineiden tuotto on monimutkaisempi ja aikaa vaativampi prosessi kuin polyklonaalisten vasta-aineiden tuotto. (Abcam® [viitattu 19.1.2012]).

Hyötynä monoklonaalisessa vasta-aineiden tuotossa on se, että saadaan tuotettua puhtaita vasta-aineita, joilla on tietylle antigeenin epitoopille omaava oma spesifinen sitoutumiskohta. Tällöin saadaan aina tuotettua oikeanlaisia spesifisiä vasta-aineita. (Abcam® [viitattu 19.1.2012].)

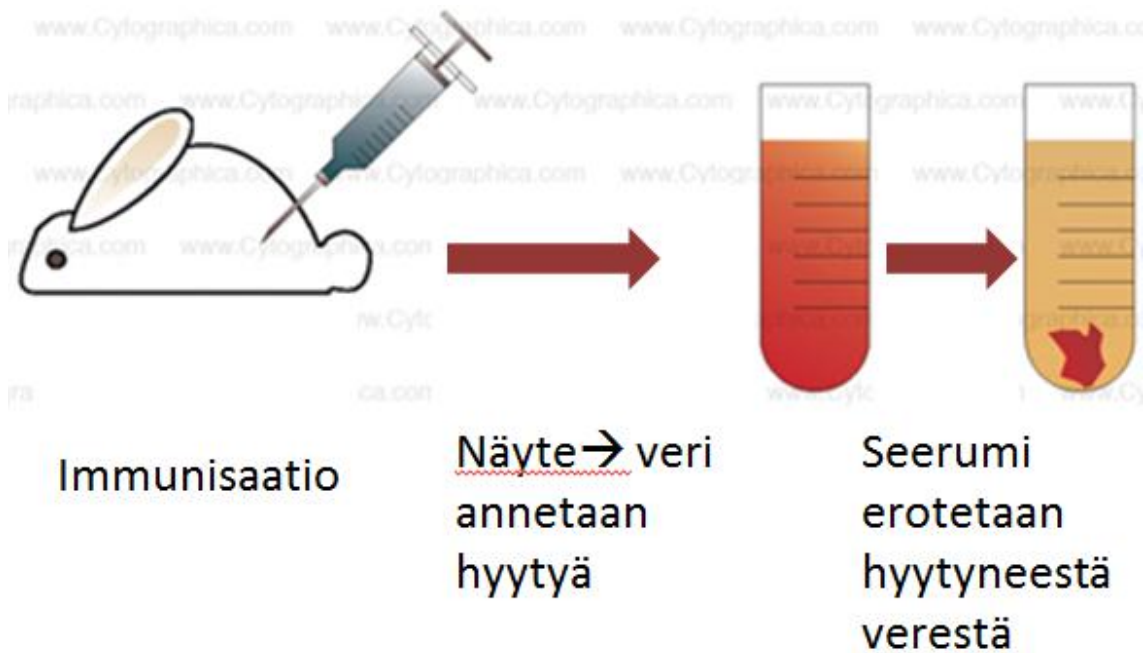
Polyklonaalisten vasta-aineiden tuotto on suhteellisen halpaa sekä teknisesti helppoa. Haittana on, että tuotetut vasta-aineet eivät välttämättä ole spesifisiä antigeenin omaaville epitoopeille suurista vasta-aineiden määristä huolimatta. (Abcam® [viitattu 19.1.2012].)

Polyklonaaliset vasta-aineet on tuotettu immunisoimalla kani eli injektoidulla kaniin valitut peptidit.

Kani tuottaa vasta-aineita vereen jo muutamassa viikossa, mutta noin viikon kuluttua injektioista antigeeni-spesifisen seerumin IgG konsentroituu takaisin lähtöarvoihin, esi-injektion tasolle. Konsentroituminen on kanin luonnonmukainen immuunivastereaktio. (Switzer & Garrity 1999, 267–268.)

Ratkaisu konsentroitumiseen on hyperimmunisaatio. Hyperimmunisaatiossa kani injektoidaan säännöllisin väliajoin. Hyperimmunisoinnilla saadaan tuotettua suuria määriä vasta-aineita, jotka tunnistavat halutut antigeenit. (Switzer & Garrity 1999, 267–268.)

Vasta-aineet saadaan talteen keräämällä kanin verta. Verestä erotetaan seerumi, jossa halutut vasta-aineet ovat. Tätä seerumia kutsutaan antiseerumiksi. Kuviossa 2 on esitetty polyklonaalisen vasta-aineen tuotto kanissa.



Kuvio 2. Polyklonaalisen vasta-aineen tuotto kanissa. (Cytographica 2008 [viitattu 19.1.2012], kuvaa muokattu)

3.2.1 Seerumit

Työssä tutkittavat seerumit saatiin immunisoiduista kaneista. Jokaiselle kohdeproteiinille oli omat seerumit. Testattavana oli 22 eri seerumi-näytettä kahtatoista kohdeproteiinia vastaan.

Kaneista kerättiin verinäytteet viisi kertaa, nämä keräykset suoritettiin Epitron EU-projektia varten. Ensimmäisen kerran verta kerättiin 38 päivän jälkeen injektoinnista. Toinen kerättiin 66 päivän jälkeen, kolmannen kerran kerättiin 87 päivän jälkeen, neljännen kerran kerättiin neljän kuukauden jälkeen ja viimeisin keräys tehtiin 4,5 kuukauden jälkeen ensimmäisestä injektointipäivästä. Verinäytteen annettiin hyytyä, jonka jälkeen siitä eroteltiin seerumi. Verihyytymään jäi verisolut, kuten fibriini ja verihiutaleet (Switzer & Garrity 1999, 268).

Seeruminäytteen oikea määrä piti testata kokeellisesti. Jos vasta-aine konsentraatio on liian korkea, se saattaa tarttua muihinkin nitroselluloosakalvossa oleviin proteiineihin, halutun kohdeproteiinin sijasta. Jos taas vasta-aineen kon-

sentraatio on liian pieni, vasta-aine ei välttämättä pysty kiinnittymään kohdeproteiiniin tehokkaasti. (Switzer & Garrity 1999, 291, 292.)

Testauksessa käytettyjä vasta-aineseerumeita oli käytetty aikaisemmissa töissä. Aiempien kokemusten perusteella seeruminäytteen laimennossuhdetta 1:500 pidettiin hyvänä. Konsentraatiosuhdetta oli mahdollista tarvittaessa myös nostaa tai laskea.

4 TESTAUSMENETELMÄT JA TYÖN SUORITUS

4.1 Solulinjat

Tutkimuksessa hyödynnettiin kohdeproteiinien ilmentymistä viljellyissä eturauhassoluissa. Solulinjat tuottivat kohdeproteiineja, joita tutkittavien vasta-aineseerumien tulisi toimiessaan tunnistaa. Solulinjat oli valittu kokeisiin joko mahdollisimman korkean tai matalan kohdeproteiinia koodaavan mRNA tason perusteella. Taulukossa on 5 esitetty solulinjojen ekspressiotasot kohdeproteiinien mukaisesti. +++ = erittäin korkea, ++ = kohtalainen, + = matala, - = ei ilmentymistä tai erittäin heikko ilmentyminen. (Henkilökohtainen tiedonanto, Paula Vainio 2010.)

Taulukko 5. Solulinjojen geenikohtaiset mRNA:n ilmentymistasot.

Proteiini	Solulinjat			
	VCaP	LNCaP	PC-3	RWPE-1
ERG	+++	-	-	-
FAM110B	+++	++	-	-
ELOVL2	+++	++	-	-
ELOVL5	-	+	-	-
ARG2	++	+++	-	+
TRIB1	+++	-	+	-
TPX2	++	++	++	++
IHH	++	+	+	+
CYP4F8	+++	-	-	-
ORM1	-	-	-	-
TMED3	++	++	+	+
RAD21	+++	++	++	+++

Käytetyistä solulinjoista VCaP on peräisin selkärankaan levinneestä metastaat-
tisesta eturauhassyövästä ja LNCaP imusolmukkeeseen levinneestä metastaat-
tisesta eturauhassyövästä. PC-3 on peräisin eturauhassyövän luumetastaasista
ja RWPE-1 on ”normaali” eturauhasen epiteelisolulinja, joka on immortalisoitu
eli kuolemattomaksi tehty. (Henkilökohtainen tiedonanto, Paula Vainio 2010.)

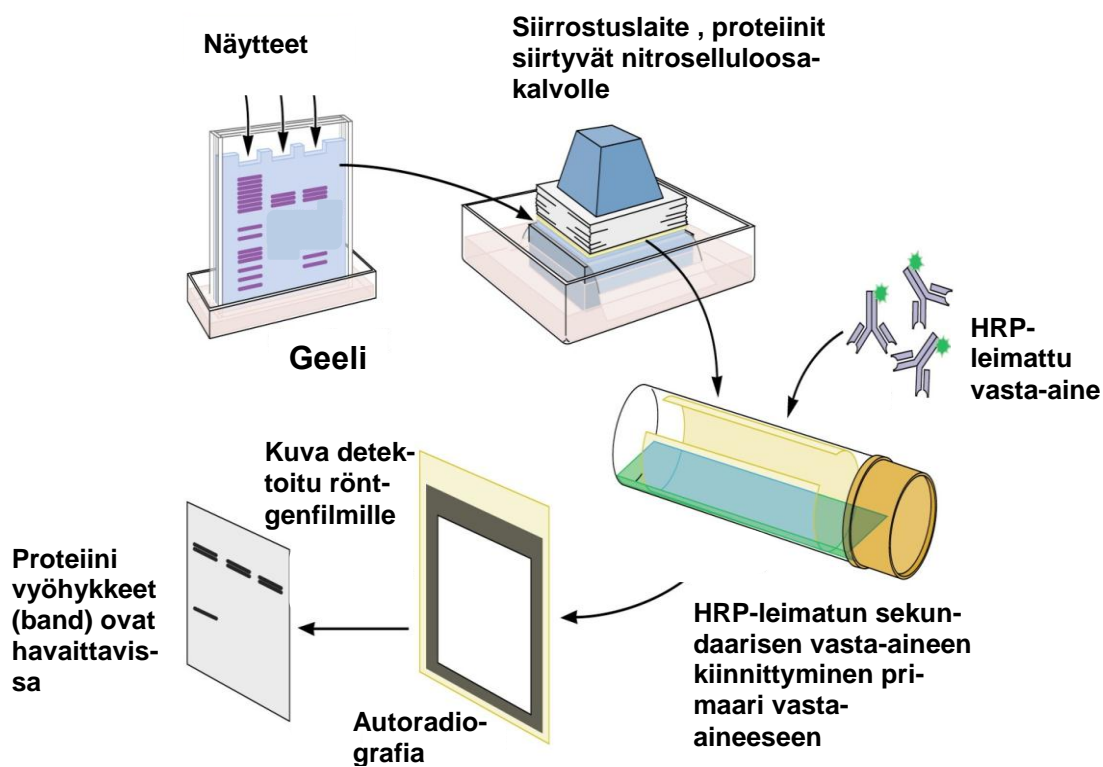
Lysaattien valmistus aloitettiin maljoilla kasvaneista soluista, jotka pestiin
PBS:llä (phosphate buffered saline). Päälle laitettiin lysis buffer (62.5 mM Tris, 1
% SDS, 5 %, β -mercaptoethanol 10 % glycerol, bromophenol blue). Annos-
tusmäärä voi olla esimerkiksi 100 μ l per 10cm malja. Valmis lysaatti kerättiin
eppendorf-putkiin ja lysaatit säilöttiin pakkasessa. (Henkilökohtainen tiedonanto,
Paula Vainio 2010.)

4.2 Western blot

Geelielektroforeesi ajossa olleet proteiinit saatiin näkyviin vyöhykkeinä nitrosel-
luloosakalvolle. Tällöin painavammat proteiinit jäävät geelissä yläpuolelle, kun
taas kevyemmät proteiinit ajautuvat alapuolelle. Kuviossa 3 on esitetty Western
blot menetelmän pääkohdat.

Antigeenejä sisältävänä näytteenä oli solulinjoista valmistetut proteiinilysaati.
Proteiinit eroteltiin polyakryyliamidigeelissä (PAGE, engl. polyacrylamide gel
electrophoresis) SDS:n (engl. sodium dodecyl sulphate) eli natriumlauryylisul-
faatin läsnä ollessa. Syntyneet proteiinivyöhykkeet siirrettiin elektroforeettisesti
nitroselluloosakalvolle. Proteiinit on mahdollista tunnistaa vasta-ainemolekyylin
avulla. Ensimmäinen vasta-aine kiinnittyy antigeenin epitoppeihin. Toinen eli
sekundaarinen vasta-aine, joka toimii leimana, kiinnittyy ensimmäiseen vasta-
aineeseen. Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin HRP-leimattua entsyymiä
(piparjuuripeksidaasientsyymi, engl. horseradish peroxidase). Tällöin proteiinin
paikallistamiseen käytettiin vahvistettua kemiluminesenssireaktiota eli ECLTM-
reaktiota (Amersham, engl. enhanced chemiluminescent reaction). ECLTM-
reaktio (Amersham) saa proteiinit näkyviin valottamisen jälkeen röntgenfilmissä.

Näkyvien proteiinien koko saadaan selville vertaamalla markkerikokoihin. Tarvittaessa kokeet toistettiin tulosten varmentamiseksi.



Kuvio 3. Western blot. (Racaniello 2010 [viitattu 19.1.2012], kuvaa muokattu)

4.3 Laitteet ja välineet

Roller mixer SRT6 Stuart By BioCote

Trasfer –machine Trans-Blot® SD Semi-Dry transfer cell Bio-Rad Model No. Trans-Blot® SD cell Serial No. 221BR 43551 Powerlimit 50 W Voltage Limit 25 VDC

Heidolph unimax 1010 Act speed 0211

Filmit: Fuji medical x-ray film, Fujifilm Super RX exp.date 2014-04 Lot # EM.
No 15606

Hyperkasetti

X-Ray table-top processor: AGFA CD 1000 (LaitelID: TL 02986)

Nitroselluloosakalvo

4.4 Reagenssit

Markkeri:

Bio-Rad Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards

Geeli:

PAGEr® Gold Precast Gels Polycrylamide gels for protein electrophoresis 4-20
% Tris-Glycine gels

Ensimmäiset vasta-aineet:

Taulukko 6. Ensimmäisten vasta-aineiden tiedot

Vasta-aine	Tiedot
#EP27	MAR08139 RABBIT N ^o :A647
#EP30	MAR08142 RABBIT N ^o :A653
#EP31	MAR08143 RABBIT N ^o :A655
#EP71	MAR08265 RABBIT N ^o :A871
#EP72	MAR08193 RABBIT N ^o :A739
#EP73	MAR08217 RABBIT N ^o :A783
#EP74	MAR08266 RABBIT N ^o :A873
#EP76	MAR08267 RABBIT N ^o :A875
#EP77	MAR08219 RABBIT N ^o :A786
#EP82	MAR08194 RABBIT N ^o :A741

#EP83	MAR08195 RABBIT N ^o :A742
#EP84	MAR08269 RABBIT N ^o :A878

Sekundaari vasta-aine:

ECL™ Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey)

SDS Ajopuskuri (PAGE 10x Running buffer):

Transfer Buffer 20% MeOH (Siirtoajopuskuri)

TBS – Tris Buffered Saline(10x)

TBST eli TBS-Tween (0,1%)

5% milk-TBS-Tween eli 5% maitoa TBST-liuoksessa:

ECL:

Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system

Reagenssit ECL-paketin sisällä:

Luminol/Enhancer Solution ja Stable Peroxide Buffer

Authoradiografian nesteet:

Developer (A) Ref. HT536 (1litre) ja Developer (B) Ref. HT536 (0,25litre)

4.5 Työn suoritus

Työssä käytettiin Western blot- menetelmää. Työ aloitettiin tekemällä tarvittavat liuokset ja reagenssit (lysaattinäytteet, SDS-ajopuskuri, siirtoajopuskuri (Trasfer buffer), TBS, TBST, 5 % maitoa TBST-liuoksessa). Solulinjanäytteet sulatettiin ja näytteitä keitettiin 95 °C 5 minuuttia. Tämän jälkeen näytteet sekoitettiin ja sentrifugoitiin ja ladattiin geelille.

Näytteet pipetoitiin 10 kuoppaiseen 4-20 % polyakryyliamidigeeliin. Työssä käytettiin valmiiksi valettuja kaupallisia geelejä (LONZA). Geelistä poistettiin suoja-teippi ja se asetettiin ajolaitteeseen. Kammio täytettiin 1x ajopuskurilla (running buffer).

Ennen näytteiden pipetointia kaivoihin, varmistettiin, että kaivoissa ei ollut ilma-kuplia. Varmistus tehtiin pipetoimalla tyhjiin kaivoihin 1x ajopuskuria (running buffer).

Solulinjanäytteet pipetoitiin kaivoihin. Näytteet valittiin siten että jokaisesta tutkitavasta kohdeproteiinista valittiin kaksi solulinjaa. Yksi solulinjoista tuotti runsaasti kohdeproteiinia vastaavaa lähetti- RNA:ta (positiivinen solulinja) ja toinen solulinja oli ekspressiotasoltaan matala. Taulukossa 5 on esitetty solulinjojen ekspressiotasot proteiinikohtaisesti (Henkilökohtainen tiedonanto, Paula Vainio 2010).

Näytteitä laitettiin kaivoihin 20 µl ja näytteiden viereen pipetoitiin kaupallinen proteiinien kokomarkkeri (Bio-Rad), jota tuli 5 µl. Taulukossa 7 on esitetty esimerkki siitä, kuinka 10-kuoppainen geeli ladataan. Numerot 1-10 edustavat kuoppia ja M edustaa kaupallista markkeria (BIO-RAD).

Taulukko 7. 10-kuoppaisen kaupallisen geelin (LONZA) täyttäminen.

Kuoppa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Proteiini	ERG			FAM110B			ELOVL2			
Solulinja	VCaP	LNCaP	M	VCaP	PC-3	M	VCaP	PC-3	M	tyhjä

Elektroforeesiajoa varten kansi laitettiin paikoilleen ja sähköä johtavat johdot oikein päin niin, että katodia (-) edusti musta johto ja anodia (+) punainen johto. Elektroforeesiajoa varten jännite asetettiin 90 volttiin ja ajo kesti noin kaksi tuntia.

Geelielektroforeesiajo oli valmis, kun näytteissä ollut sininen väri oli ajautunut geelin alareunaan. Värin avulla oli mahdollista seurata ajon etenemistä. Puhdasta ajopuskuria voitiin käyttää myös seuraavissa elektroforeesiajoissa.

Sillä välin kun geeli oli elektroforeesiajossa, tehtiin valmistelut proteiinien siirrostusta varten. Siirrostusta varten tarvittiin jokaista geeliä kohti kuusi kappaletta membraanipaperia (suodatuspaperi) ja yksi kappale membraanikalvoa eli nitroselluloosa-kalvoa. Membraanit leikattiin vähän geeliä isommiksi paloiksi. Nitroselluloosa-kalvo pistettiin membraanipapereiden väliin ja pistettiin siirtopuskuriin likoamaan (transfer buffer 20 % MeOH), ennen proteiinien siirrostusta nitroselluloosa-kalvoille Semi-Dry Transfer Cell-laitteen (Trans-Blot®) avulla.

Siirrostuslaite (Trans-Blot®) puhdistettiin ennen käyttöä vedellä ja paperilla. Nitroselluloosakalvo laitettiin liuotusastiaan, jonka alle oli pistetty kolme membraanipaperia (suodatuspaperia) päällekkäin. Tämä kastettiin siirrostus puskurilla (transfer buffer 20 % MeOH), mikä esti nitroselluloosakalvon kuivumisen siirrostusajon aikana. Jotta siirtyminen geelistä nitroselluloosakalvolle olisi tehokasta, siirrostuspuskuriin (transfer buffer 20 % MeOH) lisättiin 20 prosentista metanolia.

Geelielektroforeesiajon jälkeen geelilevy irrotettiin kammiosta ja geeli laitettiin siirrostusajoon (Trans-Blot®). Geelin kuivumisen estämiseksi geeli laitettiin 1x ajopuskuriin (running buffer) likoamaan ennen Semi-Dry Transfer Cell-laitteeseen latomista.

Nitroselluloosakalvo sijoitettiin kuuden membraanipaperin (suodatuspaperin) väliin (voileipä-tekniikka). Ensimmäiset kolme membraanipaperia (suodatinpaperia), jonka päällä oli myös nitroselluloosakalvo, otettiin siirrostuspuskuriliuoksesta pois ja asetettiin siirrostus-ajolaitteen (Trans-Blot®) sisään.

Nitroselluloosakalvon toinen (membraanikalvo/siirrostuskalvo) yläreuna merkat-
tiin jotta tiedettiin näytteiden sijainti sekä kummalla puolella membraania prote-
iinit ovat. Geeli uitettiin siirrostuspuskurissa (transfer buffer 20 % MeOH) ennen
nitroselluloosakalvon päälle asettamista. Nitroselluloosakalvon päälle asetettiin
siis geeli, josta oli poistettu geelin alareunasta mahdollinen paksumpi osa.

Toiset kolme membraanipaperia (suodatinpaperi) asetettiin geelin päälle ja kas-
tettiin vielä siirrostuspuskurilla (transfer buffer) kuivumisen ja palamisen estämi-
seksi.

Nitroselluloosakalvo oli sijoitettu anodipäätä kohti siten, että geelissä ajautuneet
proteiinit kulkeutuvat positiivista elektrodia kohti. Tällöin erottuneet proteiinit
geelissä siirtyivät nitroselluloosakalvolle.

Kuplien syntymisen estämiseksi kaulittiin membraanipaperin päältä viiden millin
pipetinkärkeä käyttämällä ylimäärät nesteet ja mahdolliset ilmakuplat pois.

Ylimäärä siirrostuspuskuria (transfer buffer) pyyhittiin pois Semi-Dry Transfer
Cell- laitteesta. Jännite säädettiin 20 voltiksi ja ajo oli käynnissä 40 minuuttia.

Ajon jälkeen kaikki muut, paitsi nitroselluloosakalvo heitettiin pois. Kalvo leikat-
tiin osiin niin, että jokaisella membraanipalalla, jota käytettiin seeruminäytteiden
testauksessa, oli kokomarkkeri. Leikatut nitroselluloosakalvot laitettiin omiin
merkattuihin 50 ml falcon-putkiin, johon pistettiin blokkausliuosta epäspesifisen
sitoutumisen estämiseksi (4 ml 5 % maitoa TBST- liuoksessa). TBST-liuos
koostui Tris-puskurista, johon oli lisätty TWEEN 20 liuosta 0.1%:ksi.

Nitroselluloosakalvot blokattiin eli peitettiin epäspesifiset sitoutumiskohdat inku-
boimalla sitä vähintään tunnin ajan huoneenlämmössä jatkuvassa pyörytyksessä
(BioCote). Tämän jälkeen membraaneita inkuboitiin tutkittavissa vasta-
aineseerumilaimennoksissa (8 µl seerumia ja 4 ml 5 % maitoa TBST:ssä,
1:500) yön yli +4 °C:ssa.

Vasta-aineen konsentraatiomäärä riippuu spesifisten proteiinien näkyvyydestä.
Helposti näkyvät spesifiset proteiinit saatiin detektoitua käyttämällä yllä mainit-
tua laimennosta 1:500. Koska tiettyä kohdeproteiinia kohti vasta-aineseerumeita

oli tuotettu sekä kahta eri peptidipätkää (A:ta tai B:tä) että näiden sekoitusta vastaan (liite1), valittiin ensin testattavaksi A-peptidiä vastaan tuotettu seerumi, ja tarvittaessa seuraavaksi testattiin B-peptidillä immunisoiduista kaneista peräisin oleva seerumi. Vasta-aineiden toimintaa tutkittaessa testattaviksi otettiin ensin seeruminäytteet molemmilla peptideillä immunisoiduista kaneista, ennen kuin seerumin konsentraatiosuhdetta alettiin nostaa (1:300).

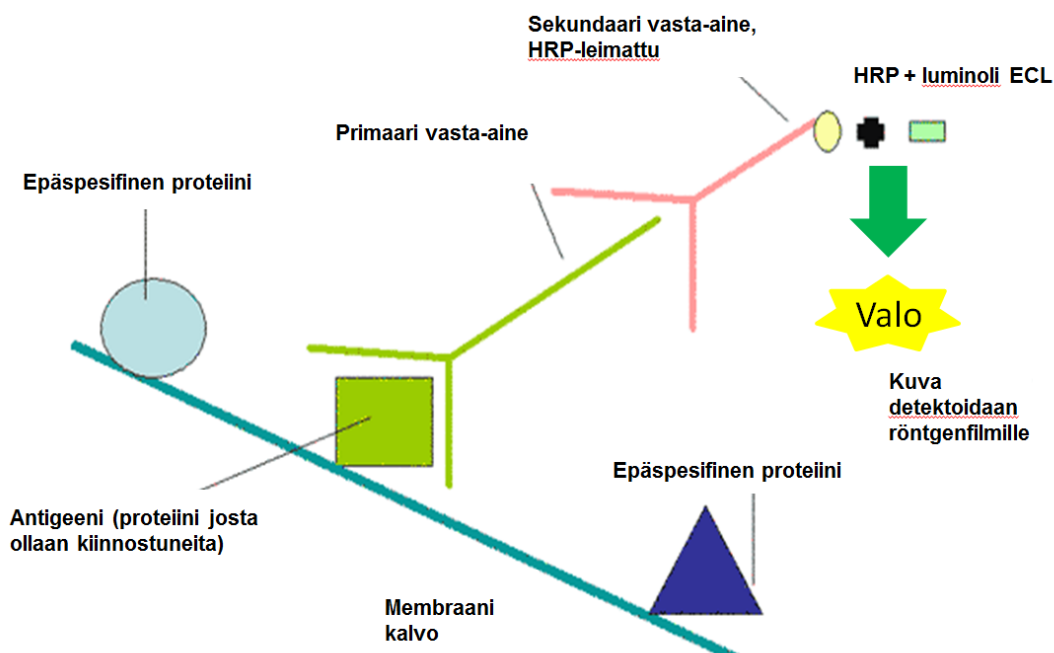
Seuraavana päivänä seerumilaimennokset kerättiin talteen ja nitroselluloosakalvot pestiin kolme kertaa noin 15 minuutin ajan 1x TBST puskurilla (engl. Tris Bufferes Saline + 0,1 % TWEEN 20 (polyoxyethylenesorbitan monolaurate, POLYSORBATE 20)). Pesut suoritettiin falcon-putkissa. Falcon-putket olivat jatkuvassa pyöryksessä myös pesujen ajan.

Pesujen tehtävänä oli poistaa epäspesifiset proteiinit, jotka olivat tarttuneet membraaniin. Pesu tehtiin TBST:llä. Tween 20 on heikko detergentti eli pintajännitystä alentava pesuaine, joka vähentää epäspesifisten proteiinien kiinnittymistä. (Switzer & Garrity 1999,292.)

Pesujen jälkeen lisättiin 4 millia 5 % maidossa olevaa TBST puskuria (engl. Tris Bufferes Saline + 0,1 % TWEEN 20 (polyoxyethylenesorbitan monolaurate, POLYSORBATE 20)) ja peitettiin epäspesifiset sitoutumiskohdat membraanilta tunnin ajan. Epäspesifisten proteiinien sitoutumiskohtien peittämisen jälkeen lisättiin sekundaari vasta-ainetta (ECL™ Anti-Rabbit IgG) 1µl. Tämän sekundaarisen vasta-aineen konsentraatiosuhde oli 1:4000. Sekundaarivasta-aineen tehtävänä oli leimautua primaari vasta-aineeseen, joka taas oli kiinnittynyt näytteessä olleeseen kohdeproteiiniin.

Sekundaarinen vasta-aine oli HRP- leimattu (piparjuuriperoksidaasientsyymi, engl. Horseradish Peroxidase). Sekundaari vasta-aine saatiin näkyviin kemiluminesenssin avulla (ECL™ Amersham, engl. enhanced chemiluminescent reaction). Kuviossa 4 on esitetty vasta-aineiden kiinnittyminen ja detektio käyttäen HRP-leimattua (horseradish peroxidase) ECL-kemiluminesenssireaktiota (engl. enhanced chemiluminescent reaction). 1 ml ECL™-reagenssia (Amersham engl. enhanced chemiluminescent reaction) pipetoitiin membraanin päälle.

ECL™-reagenssipaketissa (Amersham engl. enhanced chemiluminescent reaction) oli peroksidaasireagenssi ja luminolireagenssi, jotka sekoitettiin yhteen suhteessa 1:1.



Kuvio 4. Vasta-aineiden toimintaperiaate. (Molecular Station 2006 [viitattu 19.1.2012], kuvaa muokattu)

Kemiluminesenssireaktiossa piparjuuriperoksidaasientsyymi hapettaa luminolin peroksidaasin ja luminoli-reagenssien yhteisvaikutuksesta tuottaen valoa, jota on kuvattu kuviossa 4 (Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system 2002,9).

Nitroselluloosakalvoja inkuboitii ECL-liuoksessa (Amersham, engl. enhanced chemiluminescent reaction) minuutin ajan, jonka jälkeen ne valotettiin, vasta-aineesta riippuen, parista sekunnista viiteen minuuttiin röntgenfilmiä (Fujifilm Super RX) käyttäen.

Valotuksen jälkeen röntgenfilmissä näkyvät kokomarkkerit (Bio-Rad) merkattiin, jolloin seerumissa olleiden vasta-aineiden tunnistamien proteiinien koko oli mahdollista määrittää. Kaikki seerumit testattiin vähintään kolme kertaa. Ne seerumit, joiden havaittiin kiinnittyvän spesifisiin kohdeproteiininsa, testattiin uudestaan vielä vähintään kerran.

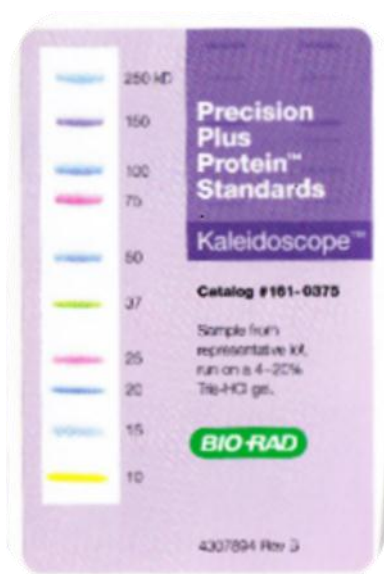
5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Tässä osiossa on esitetty tehtyjen seeruminäytteissä olleiden vasta-aineiden testauksien tulokset ja testituloksien tarkastelu. Vasta-aineiden testaukset tehtiin Western blot- menetelmää käyttäen ja proteiinivyöhykkeet saatiin näkyviin ECL™ (Amersham) kemiluminesenssireaktiota käyttäen.

Tulokset on esitetty proteiiniakohtaisesti. Kuviin on merkitty solulinjat, joista proteiinilysaatti oli peräisin, kaupallinen kokomarkkeri (Bio-Rad), ja kohdeproteiinien molekyylimassat ilmoitettuna kilo Daltoneina.

Proteiinien oletettu koko saatiin selvitettyä internet sivulta www.genecard.org, proteiinin nimen avulla.

Vasta-aineiden tunnistamien proteiinien koko selvitettiin käyttämällä kaupallista proteiinibiomarkkeristandardia, joka on esitetty kuviossa 5 (Bio-Rad).

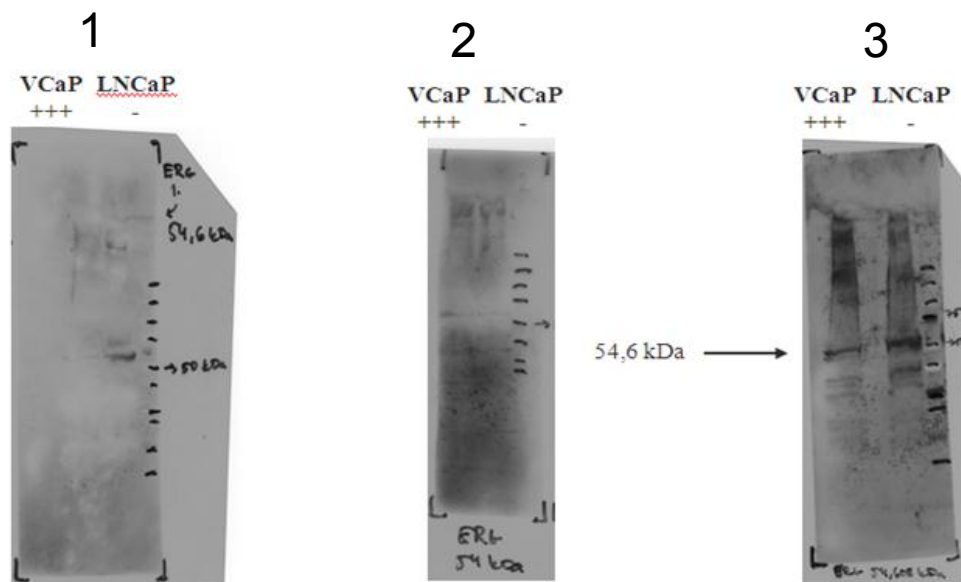


Kuvio 5. Kaupallinen proteiinibiomarkkeri standardi (Bio-Rad)

ERG

Testattu vasta-aine seerumi oli #EP27A, jota testauksessa käytettiin kolme kertaa. Vasta-aineiden immunisointi- ajankohta kaikissa kolmessa testauksessa oli 13.11.08. ERG proteiinin koko on 54,608 kDa. Primäärivasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:500
- 2) 1:300
- 3) 1:300



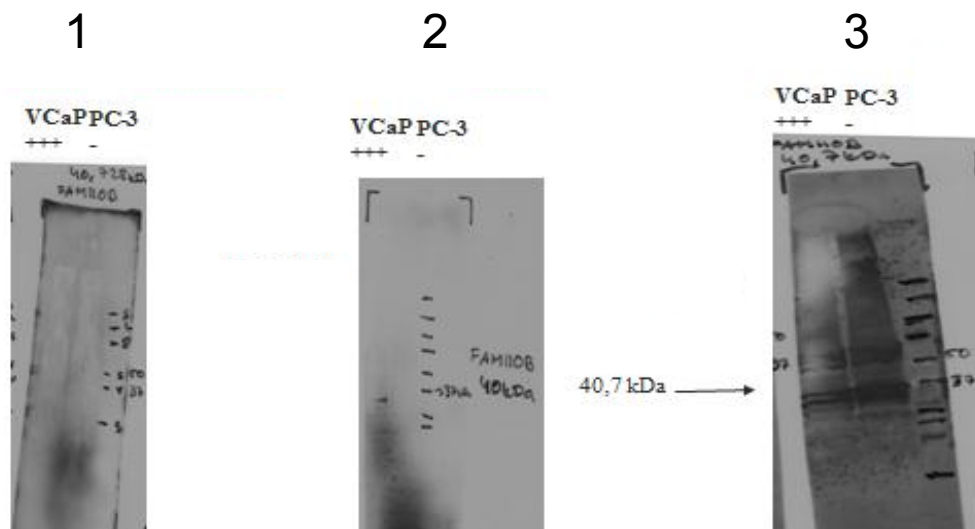
Kuvio 6. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina ERG

Saaduista tuloksista voitiin päätellä, että seeruminäytteessä ei ollut ERG- proteiinia tunnistavaa Westernissä toimivaa vasta-ainetta. Kuvissa näkyi selvästi vyöhykkeet eli bändit molempien testattujen solulinjojen kohdalla, vaikka tiedetään, että ERG ilmentyy vain VCaP soluissa.

FAM110B

Testattavana vasta-aineena oli kaikissa kolmessa testauksessa #EP30A, jonka kohdeproteiini oli FAM110B. Vasta-aineiden immunisointi- ajankohta oli kohdis-
sa 1. 08.01.2009, 2. 13.11.2008 ja 3. 08.01.2009. FAM110B proteiinin koko on 40,728 kDa. Primääri vasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:500
- 2) 1:300
- 3) 1:300



Kuvio 7. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina FAM110B

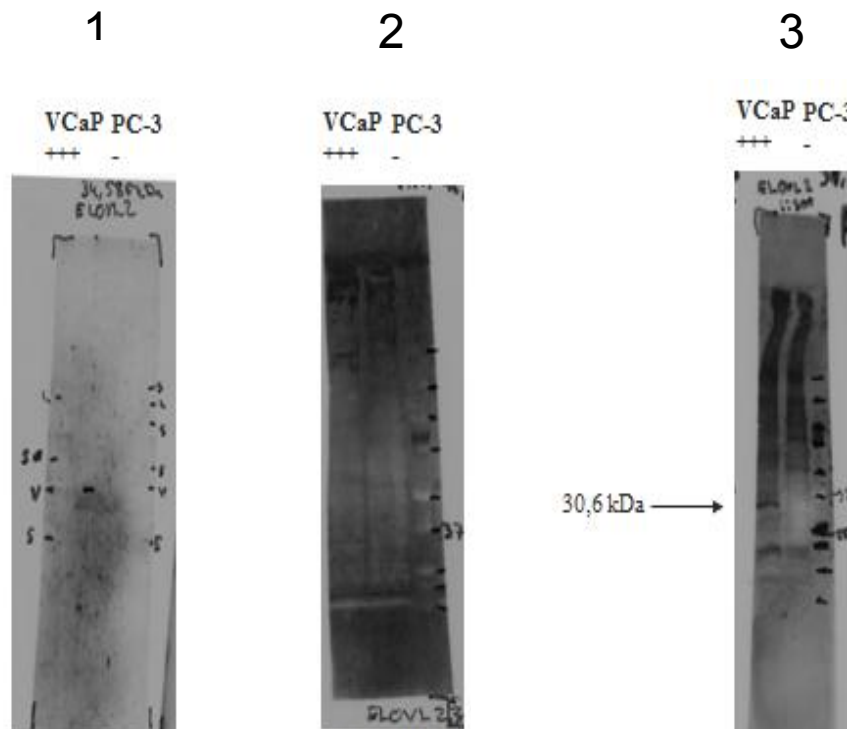
Kuvissa näkyvistä tuloksista voitiin päätellä, että seeruminäyte ei sisältänyt FAM110B- proteiinia tunnistavaa vasta-ainetta. Kuvissa näkyi selvästi proteiinivyöhykkeet molemmista solulinjoista tehdyissä proteiinilysaateissa, vaikka FAM110B:n tiedetään ilmentyvän lähinnä VCap- soluissa. Lisäksi nähdyt proteiinivyöhykkeet olivat molekyylipainoltaan erikokoisia kuin FAM110B-proteiini.

Näiden tulosten perusteella voitiin päätellä, että testattu vasta-aine ei sovellu FAM110B proteiinin havaitsemiseen Western blot- menetelmällä.

ELOVL2

Testattavana seeruminäytteenä oli #EP31A, jonka kohdeproteiini oli ELOVL2. Vasta-aineiden immunisointi- ajankohta oli kohdissa 1. 08.01.2009, 2. 13.11.2008 ja 3. 13.11.2008. ELOVL2 proteiinin koko on 34,585 kDa. Primääri vasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:500
- 2) 1:500
- 3) 1:300



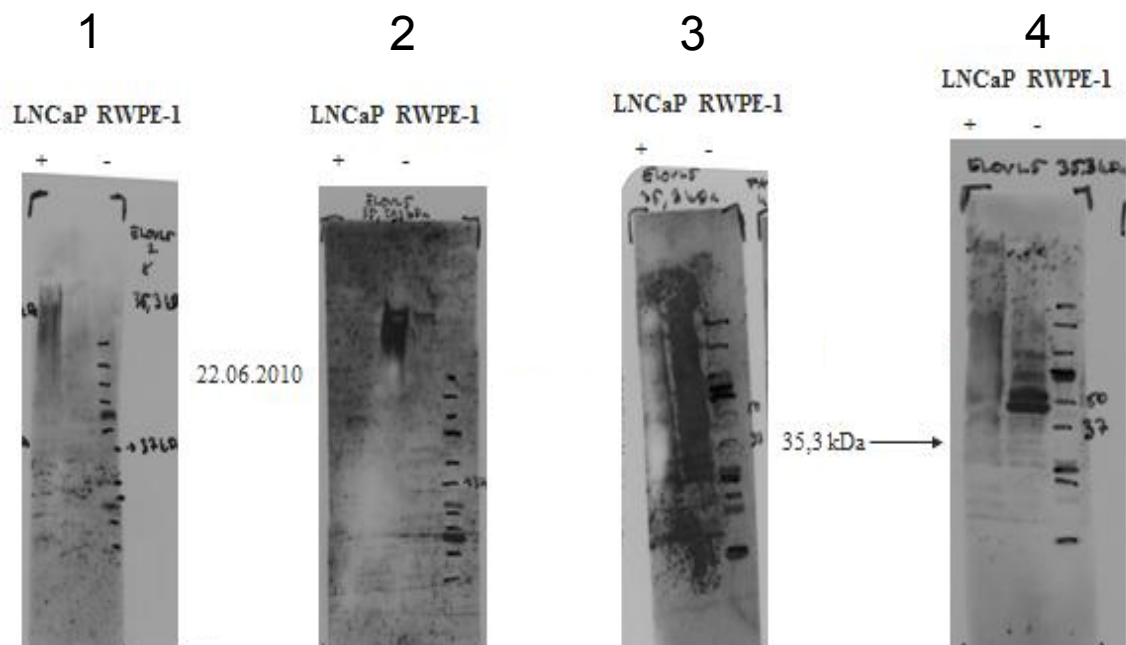
Kuvio 8. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina ELOVL2

Saaduista tuloksista voitiin päätellä, että seeruminäytteessä oleva vasta-aine tunnistaa ELOVL2 –proteiinin. Kalvossa 3 näkyi selvästi proteiinivyöhyke positiivisessa solulinjassa juuri oikealla kohdalla.

ELOVL5

Testattavana näytteenä oli #EP71mix seerumi, jonka kohdeproteiini oli ELOVL5. Vasta-aineiden immunisointi- ajankohta oli kohdissa 1. 08.01.2009, 2. 08.01.2009, 3. 03.11.2008 ja 4. 03.11.2008. ELOVL5 proteiinin koko on 35,293 kDa. Käytetyt primäärivasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:500
- 2) 1:300
- 3) 1:300
- 4) 1:300



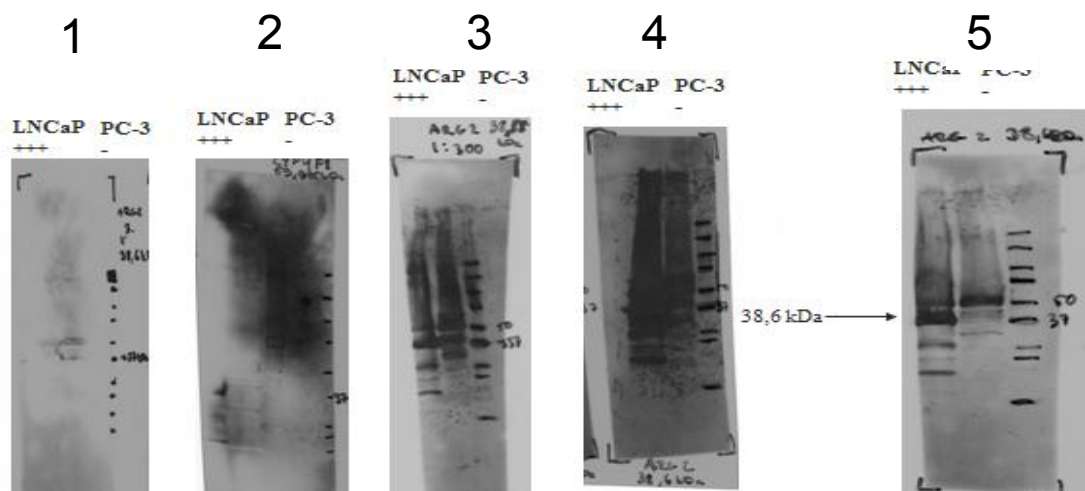
Kuvio 9. Vasta-aineiden testaus, kohdeproteiinina ELOVL5

Kuvissa esitetyistä tuloksista voitiin päätellä, että testattu seerumivasta-aine ei tunnistanut ELOVL5- proteiinia. Kuviossa 9 näkyy epäselvästi proteiinivyöhykkeet. Viimeisimmässä kuvassa näkyy heikosti molempien solulinjojen signaalit, mutta myös tämä signaali on epäspesifistä.

ARG2

Testattavana vasta-aineena oli #EP27mix, jonka kohdeproteiini oli ARG2. Vasta-ainetta testattiin viisi kertaa, ja näiden vasta-aineiden immunisointi- ajankohta oli kohdissa 1. 13.11.2008, 2. 27.11.2008, 3. 27.11.2008, 4. 27.11.2008 ja 5. 27.11.2008. ARG2 proteiinin koko on 38,578 kDa. Primäärivasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:500
- 2) 1:300
- 3) 1:300
- 4) 1:400
- 5) 1:400



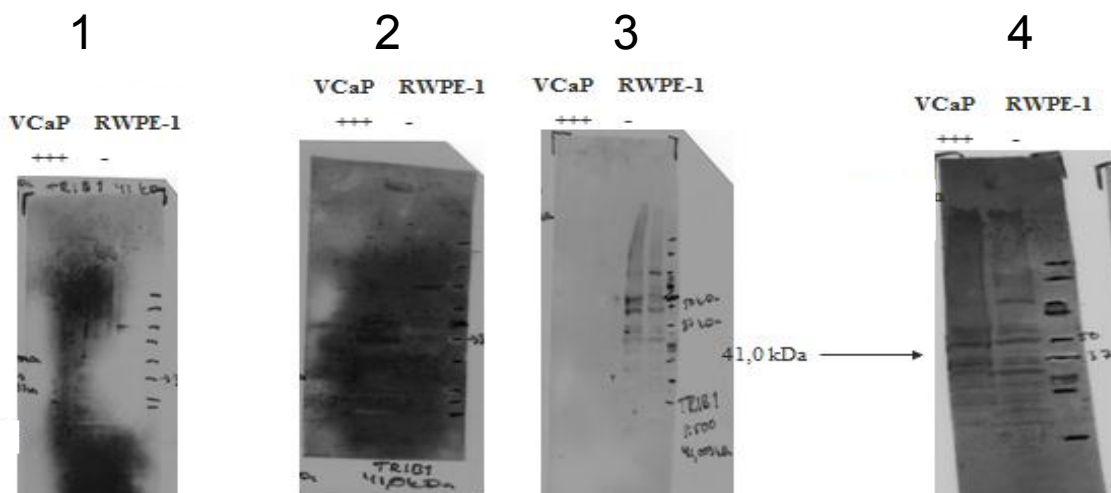
Kuvio 10. Vasta-aineiden testaus, kohdeproteiinina ARG2

Kuvien perusteella voitiin päätellä, että vasta-aine tunnistaa ARG2-proteiinin. Erityisesti kalvossa 5 näkyi selvästi proteiinvyöhyke positiivisessa solulinjassa. Positiivisen solulinjan ekspressiotaso on korkeampi kuin negatiivisen solulinjan omaava. Kuitenkin tämä seerumivasta-aine antaa myös paljon epäspesifistä signaalia.

TRIB1

Kohdeproteiinille TRIB1 testattavana vasta-aine oli #EP73mix. Vasta-aineiden immunisointi- ajankohta oli kohdissa 1. 11.12.2008, 2. 26.2.2009, 3. 26.2.2009 ja 4. 26.2.2009. TRIB1 -proteiinin koko on 41,009 kDa. Käytetyt primäärivasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:300
- 2) 1:500
- 3) 1:500
- 4) 1:300



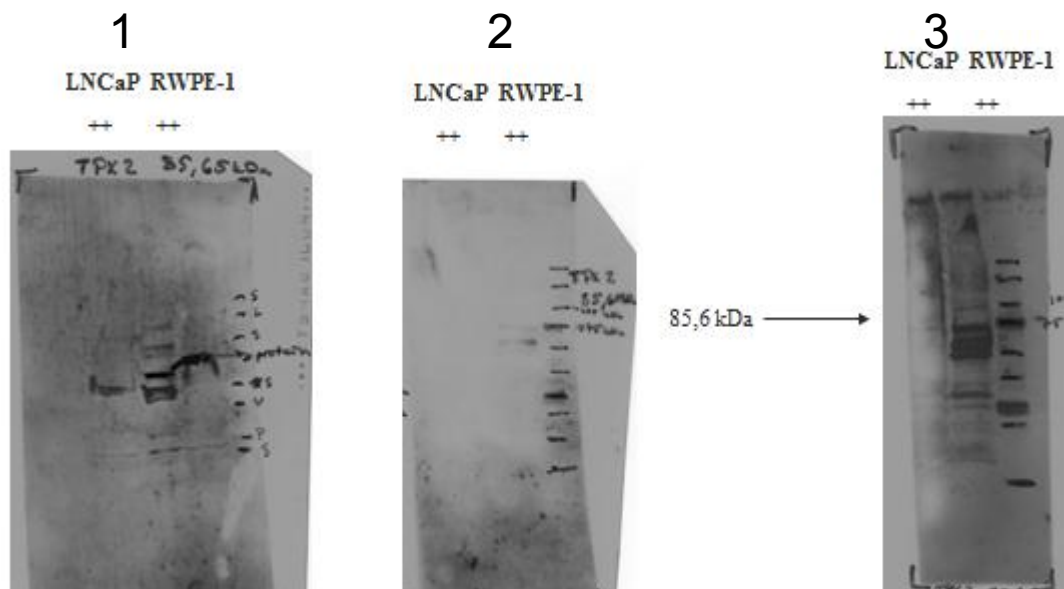
Kuvio 11. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina TRIB1

Kuvien perusteella voitiin päätellä, että vasta-aine ei toiminut. Kuviossa 11 näkyy proteiinivyöhykkeitä, mutta ne ovat kaikki väärässä kohdassa.

TPX2

Testattavana vasta-aineena oli #EP74mix, jonka kohdeproteiini oli TPX2. Vasta-aineiden immunisointi- ajankohta oli kohdissa 1. 08.01.2009, 2. 08.01.2009 ja 3. 08.01.2009. TPX2 proteiinin koko on 85,653 kDa. Primääri vasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:500
- 2) 1:300
- 3) 1:300



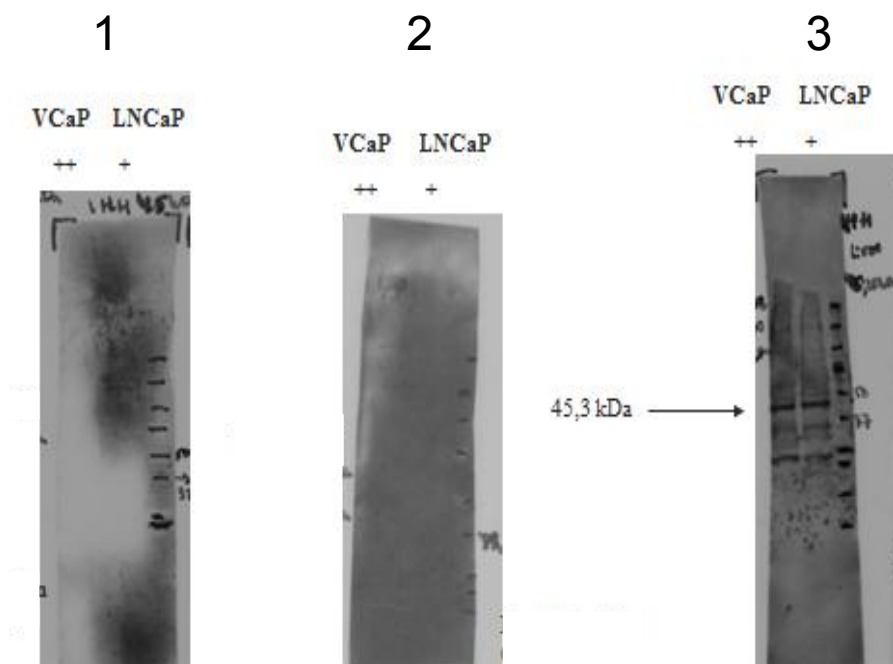
Kuvio 12. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina TPX2

Kuvien perusteella, saaduista tuloksista voitiin päätellä, että vasta-aine ei toiminut tälle kyseiselle. Ensimmäisessä ja viimeisimmässä kuvassa näkyy vain epäspesifisiä proteiinivyöhykkeitä.

IHH

Testattavana vasta-aineena oli #EP76mix, jonka kohdeproteiini oli IHH. Vasta-aineiden immunisointi- ajankohta oli kohdissa 1. 08.01.2009, 2. 03.11.2008 ja 3. 03.11.2008. IHH proteiinin koko on 45,251 kDa. Primäärivasta-aineen konsentratiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:300
- 2) 1:500
- 3) 1:500



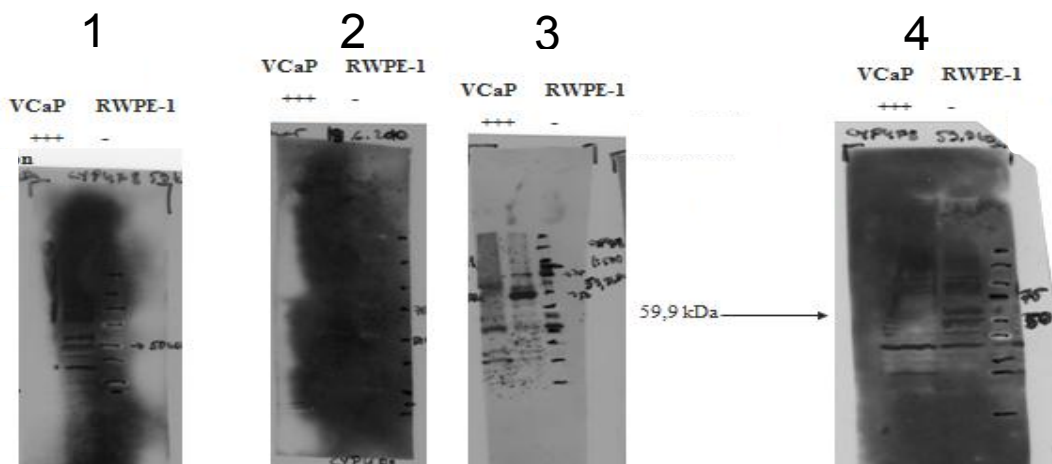
Kuvio 13. Vasta-aineiden testaus, kohdeproteiinina IHH

Kuvissa näkyi selvästi oikean kokoinen proteiinivyöhyke molemmissa positiivisissa solulinjoissa. Saaduista tuloksista voitiin päätellä, että vasta-aine toimii kyseiselle IHH- proteiinille.

CYP4F8

Testattavana vasta-aineena oli #EP77mix, jonka kohdeproteiini oli CYP4F8. Vasta-aineiden immunisointi- ajankohta oli kohdissa 1. 11.12.2008, 2. 06.10.2008, 3. 06.10.2008 ja 4. 11.12.2008. CYP4F8- proteiinin koko on 59,995 kDa. Primäärivasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:300
- 2) 1:500
- 3) 1:500
- 4) 1:500



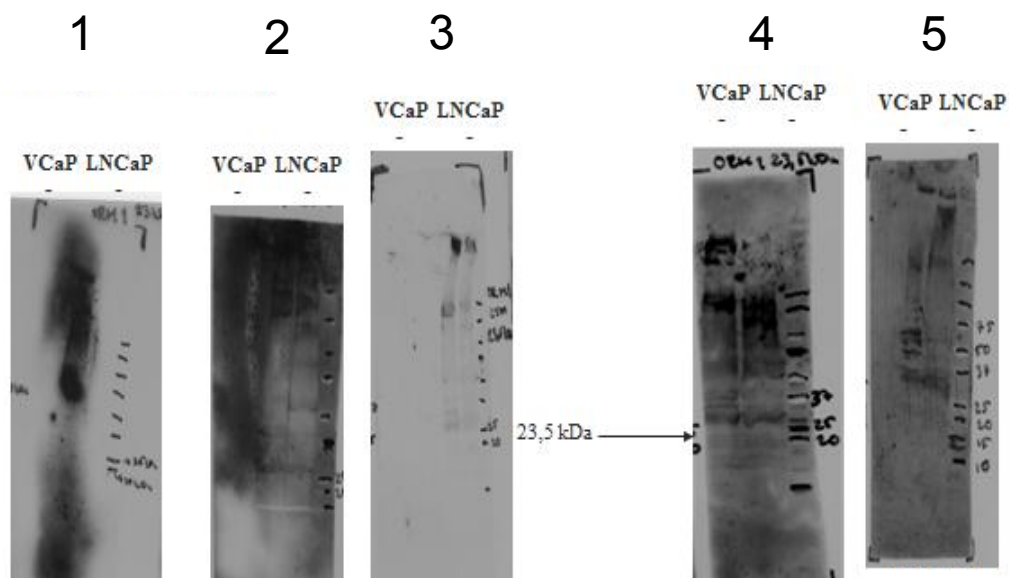
Kuvio 14. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinin CYP4F8

Kuviossa 14 näkyy negatiivisen solulinjan proteiinivyöhyke. Tavoitteena oli saada ekspressiotasoltaan positiiviselta solulinjalta signaali näkyviin. Epäspesifisten proteiinivyöhykkeiden ja väärin signaalien takia, päädyttiin siihen tulokseen, että vasta-aine ei toiminut CYP4F8-proteiinille.

ORM1

Testattavana vasta-aineena oli kaikissa kolmessa testauksessa #EP82, jonka kohdeproteiini oli ORM1. Vasta-aineiden immunisointi- ajankohta oli kohdissa 1. 27.11.2008, 2. 22.09.2008 ja 3. 22.09.2008, 4. 22.09.2008 ja 5. 22.09.2008 ORM1 proteiinin koko on 23,512 kDa. Primääri vasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:300
- 2) 1:500
- 3) 1:500
- 4) 1:300
- 5) 1:200



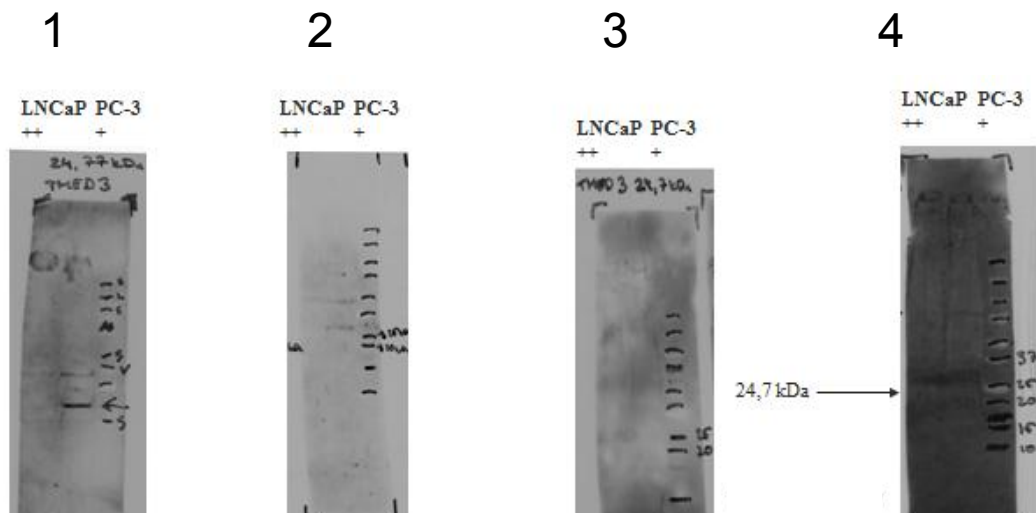
Kuvio 14. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina ORM1

Kuviossa 15 näkyy epäspesifisiä proteiinivyöhykkeitä. Saaduista tuloksista voitiin päätellä, että vasta-aine ei toiminut tälle kyseiselle ORM1- proteiinille.

TMED3

Kohdeproteiini TMED3:lle testattavana vasta-aineena oli kaikissa kolmessa testauksessa #EP83mix. Vasta-aineiden immunisointi-ajankohta oli kohdissa 1. 27.11.2008, 2. 27.11.2008, 3. 22.09.2008 ja 4. 22.09.2008. TMED3 proteiinin koko on 24,777 kDa. Primääri vasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:500
- 2) 1:300
- 3) 1:300
- 4) 1:100



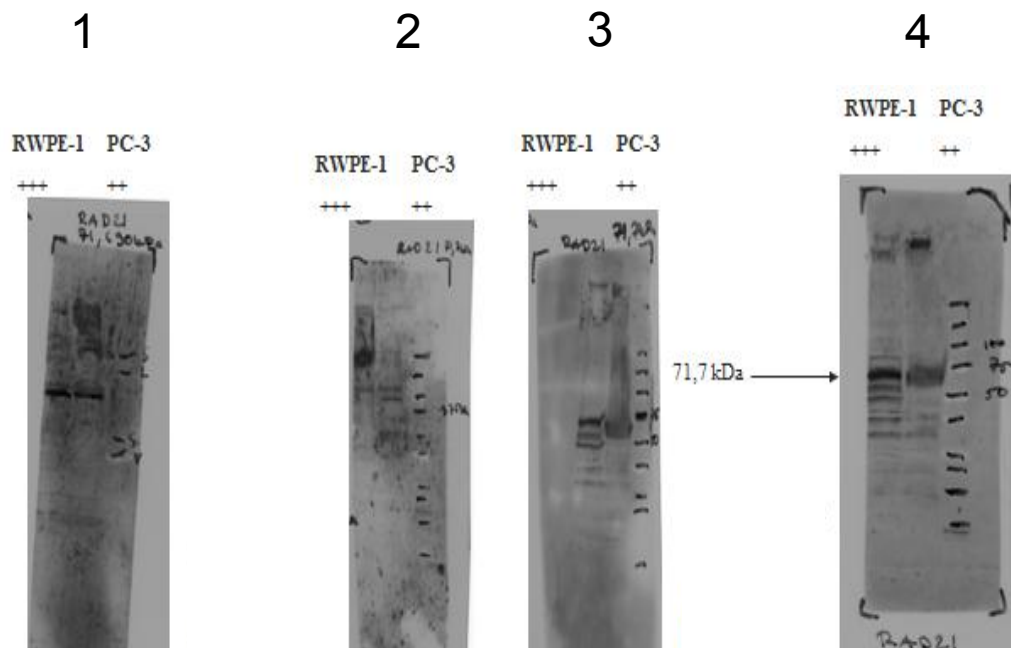
Kuvio 15. Vasta-aineen testaus, kohdeproteiinina TMED3

Kuviossa 16 näkyy erittäin heikkoja ja vähäisiä vääriä signaaleja. Tavoitteena oli saada ekspressiotasoltaan positiiviselta solulinjalta signaali näkyviin. Epäspesifisten proteiinivyöhykkeiden ja väärin signaalien johdosta päädyttiin siihen tulokseen, että vasta-aine ei toiminut TMED3-proteiinille.

RAD21

Testattavana vasta-aineena oli kaikissa kolmessa testauksessa #EP84mix, jonka kohdeproteiini oli RAD21. Vasta-aineiden immunisointi- ajankohta oli kohdis-
sa 1. 08.01.2009, 2. 08.01.2009, 3. 03.11.2008 ja 4. 03.11.2008. RAD21 proteiinin koko on 71,690 kDa. Primääri vasta-aineen konsentraatiosuhteet olivat seuraavanlaiset:

- 1) 1:500
- 2) 1:300
- 3) 1:300
- 4) 1:300



Kuvio 16. Vasta-aineiden testaus, kohdeproteiinina RAD21

Kuviossa 17 näkyi selvästi proteiinvyöhyke molemmissa positiivisissa solulin-
joissa. Tuloksena saatiin siis oikeanlaista signaalia. Vasta-aine toimii kyseiselle
kohdeproteiinille, joten tämä vasta-aine voidaan soveltaa käytettäväksi merkki-
aineiden jatkotutkimuksissa.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työssä testattiin 22 vasta-aineseerumin toimivuutta 12 eri kohdeproteiinille. Vasta-aineet testattiin käyttämällä Western blot- menetelmää. Tutkituista 22 vasta-aineseerumista neljä vasta-ainetta näytti tunnistavan spesifiset kohdeproteiinit.

Western blot menetelmänä on yksinkertainen ja sen käyttö sellaisenaan tulosten tarkasteluun ei anna syvempää tietämystä vasta-aineiden todellisesta luonteesta.

Vasta-aineiden ongelmana oli joissain tapauksissa se, kun jotkut vasta-aineet antoivat heikkoja vääriä signaaleja. Syytä tähän ei pystytty selvittämään, koska vastassa oli rajallinen työskentelyaika. Työ oli joskus aikaa vievää, koska kuvien heikkojenlaatujen vuoksi, jotkut testaukset jouduttiin tekemään jopa viisi kertaa. Kuvien laatujen heikkouteen voitiin vaikuttaa ja parantaa muun muassa konsentraatiota ja valotusaikaa muuttamalla.

Kaikissa tapauksissa vasta-aineiden konsentraatiomäärää ja valotusaikaa muuttamallakaan ei voitu parantaa kuvanlaatuja. Tällöin alettiin epäillä joidenkin vasta-aineiden laadun huonontumista lopputestauksien yhteydessä.

Käsiteltäessä vasta-aineseerumeja lämpötiloista pitää olla tarkkana. Primaariset vasta-aineet olivat pakastettuja ja niitä jouduttiin aina sulattelemaan aina kun niitä käytettiin. Tämä pakastus-sulatus toiminta voi saada aikaan denaturoimisreaktion.

Olisi ollut suositeltavaa säilyttää vasta-aineet pienemmissä säilytyspulloissa, jolloin vasta-aineseerumi määräksi olisi voitu laittaa 200 µl/säilytyspullo.

Työssä käytettiin kaupallisia polyakrylamidigeelejä (LONZA), jotka ovat voineet vaikuttaa tuloksiin negatiivisesti, jos niiden valmistuksessa on ollut puutteellisia epäkohtia. Ongelmana kaupallisten geelien koostumuksesta on ollut muun muassa geelissä esiintyneet huokoiset reiät, mikä tekee geelistä rakenteeltaan

heikon, jolloin näytteet ovat voineet ajautua pois geeliltä. Huokoinen rakenne on voitu huomatta vasta geelielektroforeesi ajon jälkeen, ennen proteiinien siirtämistä nitroselluloosakalvolle.

Osassa työssä testatuista 22 vasta-aineesta näkyi epäspesifistä sitoutumista muihin kuin kohdeproteiiniin ja osassa signaalia ei saatu näkymään. 12 proteiinista neljälle löytyi mahdollisesti toimiva vasta-aine jatkotutkimuksia varten. Nämä neljä toimivaa vasta-ainetta oli kohdeproteiinien ARG2, IHH, ELOVL2 ja RAD21 vasta-aineet.

Tulevaisuuden kannalta on parasta kehittää eturauhassyöpäspesifisempi merkkiaine. Testatuista vasta-aineista neljä olivat potentiaalisia jatkotutkimuksia varten, tämä antaa jonkinlaista tulevaisuuden toivoa siitä, että oikeanlaisten vasta-aineiden löydettyä, voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti tutkia ja mitata eturauhassyöpää.

LÄHTEET

(Abcam® 1998-2012. Polyclonal and monoclonal: A comparison. Key differences, advantages and disadvantages of polyclonal and monoclonal antibodies. Viitattu 19.1.2012 <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11269&pid=11287>

Biomeditech.Tampereen yliopisto 2011. Institute of Biomedical Technology (IBT). Viitattu 24.12.2011: Saatavilla <http://www.uta.fi/ibt/institute/research/schleutker/patientsa.html> > For patients

GE Healthcare 2002. Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system. ss. 9.

GeneCards® 1996. Search the GeneCards human gene database. Viitattu 11.6.2010 www.genecards.org

Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. 2011. Immunologia: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. kirja 2. 1.painos. Porvoo : Wookwell Oy

Iljin, K; Kallioniemi, O 2007. ETS-fuugiogeenit aiheuttavat eturauhassyövän. Duodecim terveyskirjasto: No. 22/2007, 123(22):2653-4. Viitattu 26.12.2011 <http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo96870.pdf>

Joensuu, H.; Roberts, P.J.; Teppo, L; Tenhunen, M. 2007 Syöpätaudit. 3.painos. ss. 434,435,436. Duodecim. Jyväskylä. Suomi

MedicineNet 2011. Definition of Memory B cells. Viitattu 22.8.2011 <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=11644>

MedicineNet 2011. Definition of Memory B cells. Viitattu 22.8.2011 <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=2413>

Molecular Station 2006. Western blot. Viitattu 19.1.2012 http://www.google.fi/imgres?q=principles+of+ECL+Western+blotting&um=1&hl=fi&sa=N&biw=1366&bih=677&tbn=isch&tbnid=sP-CJ9m-5DMOVM:&imgrefurl=http://www.molecularstation.com/protein/western-blot/&docid=shafG_zgY-azCM&imgurl=http://www.molecularstation.com/images/western-blot.gif&w=600&h=356&ei=xg4fT4aXGMf34QSE46TBDw&zoom=1&iact=hc&vpx=1033&vpy=169&dur=2327&hovh=173&hovw=292&tx=163&ty=96&sig=116357331373316112548&page=1&tbnh=116&tbnw=196&start=0&ndsp=18&ved=1t:429,r:5,s:0 (<http://www.molecularstation.com/protein/western-blot/>)

Mustajoki, P. ; Kaukua, J. Duodecim terveyskirjasto 2008. Miesten tutkimuksia. Artikkelin tunnus: snk03230 (003.177). Viitattu 24.12.2011 http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03230

Racaniello, V. 2010. Virology blog. Virology toolbox: the western blot. Viitattu 19.1.2012 <http://www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot/>

Roland, J. 2008. Cytographica. Production and Purification of Polyclonal Antibodies. Viitattu 19.1.2012 <http://www.cytographica.com/overheads/antibody.html>

Solunetti 2006. Viitattu 21.8.2011. Saatavilla: <http://www.solunetti.fi/> > Histologia > imukudos > immuunipuolustus > adaptiivinen immuunivaste > B-solut

Solunetti 2006. Viitattu 22.8.2011. Saatavilla: <http://www.solunetti.fi/> > Histologia > imukudos > immuunipuolustus > adaptiivinen immuunivaste

Suomalainen eturauhassyöpä 2007. Viitattu 7.9.2011. Saatavilla: <http://www.suomalaineneturauhassyopa.fi/sivut/> > Riskitekijöistä

Suomen syöpärekisteri 2009. Uusien tapausten lukumäärät, yleisimpien syöpien mennyt ja ennustettu trendi, miehet 2009. Viitattu 19.1.2012. Saatavilla: <http://www.cancer.fi/syoparekisteri/> > Tilastot > Grafiikkaa syövän yleisyydestä > Uusien tapausten lukumäärät, yleisimpien syöpien mennyt ja ennustettu trendi > miehet

Suomen syöpärekisteri 2011. Keskimääräiset syöpätapausten määrät vuosina 1963-2009 primaaripaikoittain ja kalenterijaksottain, MIEHET. Viitattu 19.1.2012. Saatavilla: <http://www.cancer.fi/syoparekisteri/> > tilastot > ajantasaiset perustaulukot > koko maa > insidenssi aikajaksottain > uusien tapausten määrät > miehet

Suomen syöpärekisteri 2011. Yleisimmät syöpäkuolemansyyt vuonna 2009, MIEHET. Viitattu 19.1.2012. Saatavilla: <http://www.cancer.fi/syoparekisteri/> > tilastot > ajantasaiset perustaulukot > koko maa > Kuolleisuus > Syöpäkuolleet syövän yleisyyden mukaan > miehet

Suominen, I. 2010. Viitattu 9.7.2011. Diagnostiikka- kurssin materiaali. ss.8,15,18, 20,21, 23,51

Suominen, I. 2010. Viitattu 8.5.2011. Solubiologia- kurssin materiaali. ss.75

Suomisanakirja 2011. Polyklonaalinen vasta-aine. Viitattu 14.10.2011 <http://suomisanakirja.fi/polyklonaalinen%20vasta-aine>

Switzer, R.L.; Garrity, L.F. 1999. Experimental biochemistry. Theory and exercises in fundamental methods. 3. painos. ss. 267, 268, 291, 292. W.H. Freeman and Company, New York, United State of America.

Syöpäjärjestöt 2005. Viitattu 19.1.2012. Saatavilla: <http://www.cancer.fi/> > Tietoa syövästä > Syöpätauteja > Eturauhasen syöpä > Levinneisyysluokitus

Syöpäjärjestöt 2005. Viitattu 19.1.2012. Saatavilla: <http://www.cancer.fi/> > Tietoa syövästä > Syöpätauteja > Eturauhasen syöpä > Hoito

Syöpäjärjestöt 2009. Viitattu 19.01.2012. Saatavilla: www.cancer.fi > tietoa syövästä > syöpätauteja > eturauhasen syöpä > sairastuminen eturauhasen syöpään

The EPITRON Project 2006. EPIgenetic TReatment Of Neoplastic disease. Viitattu 19.1.2012 <http://epitron.eu/>

Van Dam-Miers, M.C.E. ; De Jeu, W.H.; De Vries, J.; Cukker, B.R.; James, J.M.; Leach, C.K.; Patmore, R.A. 1994. BIOTOL, BIOTECHNOLOGY BY OPEN LEARNING. Technological Applications of Immunochemicals. 1. painos. ss. 212. BUTTERWORTH-HEINEMANN, Oxford, UK.

Vasta-aineiden infotaulukko

Vasta- aineen numero	IMMUNISAATIO							
	Peptidit	Kohdeproteiini	START	1st bleed	2nd bleed	3rd bleed	4th bleed	Last bleed
			Day 0	Day 38	Day 66	Day 87	4 months	4,5 months
#EP27	#EP27A - 64605	ERG	Sept 8	Oct 16	Nov 13	Dec 11	Jan 8, 09	Jan 29, 09
	#EP30A - 64611		Sept 8	Oct 16	Nov 13	Dec 11	Jan 8, 09	Jan 29, 09
#EP30	#EP30B - 64612	FAM110B						
#EP31	#EP31A - 64613	ELOVL2	Sept 8	Oct 16	Nov 13	Dec 11	Jan 8, 09	Jan 29, 09
	#EP31B - 64614							
#EP71	#EP71A	ELOVL5	Nov 3	Dec 11	Jan 8, 09	Feb 5	March 5	March 26
	#EP71B							
#EP72	#EP72A	ARG2	Sept 22	Oct 30	Nov 27	Dec 25	Jan 22, 09	Feb 12, 09
	#EP72B							
#EP73	#EP73A	TRIB1	Oct 6	Nov 13	Dec 11	Jan 8, 09	Feb 5	Feb 26
	#EP73B							
#EP74	#EP74A	TPX2	Nov 3	Dec 11	Jan 8, 09	Feb 5	March 5	March 26
	#EP74B							
#EP76	#EP76A	IHH	Nov 3	Dec 11	Jan 8, 09	Feb 5	March 5	March 26
	#EP76B							
#EP77	#EP77A	CYP4F8	Oct 6	Nov 13	Dec 11	Jan 8, 09	Feb 5	Feb 26
	#EP77B							
#EP82	#EP82	ORM1	Sept 22	Oct 30	Nov 27	Dec 25	Jan 22, 09	Feb 12, 09
#EP83	#EP83A	TMED3	Sept 22	Oct 30	Nov 27	Dec 25	Jan 22, 09	Feb 12, 09
	#EP83B							
#EP84	#EP84A	RAD21	Nov 3	Dec 11	Jan 8, 09	Feb 5	March 5	March 26
	#EP84B							

Reagenssien tiedot

Markkeri:

Bio-Rad Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards 500 µl Catalog # 161-0375 Control 31007642 Exp.7/28/2011

Geeli:

PAGEr® Gold Precast Gels Polycrylamide gels for protein electrophoresis 4-20 % Tris-Glycine gels. Wells 16 and 10: thickness is 1 mm, quantity 10 gels and size is 9*10 cm. Valmistaja: LONZA.

SDS Ajopuskuri (PAGE 10x Running buffer):

30,3 g Tris + 144,0 g Glycine + 10,0 g SDS, täytä pullo 1 litraan asti milli-Q-vedellä ja säädä pH 8,3.

Tris: Sigma Lot.052K0085 (Tris[hydroxymethyl]aminomethane), minimum 99 %(titration)(77-86-1), Ec. No.201-064-4

Glycine for electrophoresis G8898-1 kg, Batch #128K01941 (Sigma life science) Ec. No. 200-272-2

Sodium dodecyl sulfate Lot #079K0314, L4390-500 g (Sigma life science)

Ensimmäiset vasta-aineet:

Vasta-aine	Tiedot
#EP27	MAR08139 RABBIT N ^o :A647
#EP30	MAR08142 RABBIT N ^o :A653
#EP31	MAR08143 RABBIT N ^o :A655
#EP71	MAR08265 RABBIT N ^o :A871
#EP72	MAR08193 RABBIT N ^o :A739
#EP73	MAR08217 RABBIT N ^o :A783
#EP74	MAR08266 RABBIT N ^o :A873
#EP76	MAR08267 RABBIT N ^o :A875
#EP77	MAR08219 RABBIT N ^o :A786
#EP82	MAR08194 RABBIT N ^o :A741
#EP83	MAR08195 RABBIT N ^o :A742
#EP84	MAR08269 RABBIT N ^o :A878

Sekundaari vasta-aine:

ECL™ Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey), 1 ml NA934V, lot.364579, LNA934V/AC

Transfer Buffer 20% MeOH (Siirtoajopuskuri)

Määrä 10X:

30,3 g Tris + 144,0 g Glycine + 5,0 g SDS: täytä pullo 1 litraan asti milli-Q-vedellä ja säädä pH 8,3.

Transfer puskuri: 100ml (10x määrä) + 700ml water (milli-Q) ja 200 ml metanolia

Methanol: Lot 91200 Sigma Alorich Ec No.2006596

Tris: Sigma Lot.052K0085 (Tris[hydroxymethy]aminomethane), minimum 99 % (titration)(77-86-1), Ec. No.201-064-4

TBS – Tris Buffered Saline(10x)

87,7g NaCl ja 24,3 g Tris: täytä pullo 1 litraan asti milli-Q-vedellä ja säädä pH 7,6

NaCl (Sigma life science, batch # 118K0037 EC No.231-598-3, WGK:CH-GiH FREI Cat.S3014-5 kg)

Tris: (Sigma 7-9® Lot.052K0085 (Tris[hydroxymethy]aminomethane), minimum 99 % (titration)(77-86-1), Ec. No.201-064-4

TBST eli TBS-Tween (0,1%) 3litraa:

2,7 litraa milli-Q vettä + 0,3 litraa TBS+ 3 ml Tween (20%)

5% milk-TBS-Tween eli 5% maitoa TBST-liuoksessa:

TBST (TBS-Tween) 100ml + 5,0 g maitojauhetta (Rasvaton maitojauhe, Valio, valmistettu 19.11.09 exp.date 22.5.11)

ECL:

Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system, Product Booklet codes: RPN2106/8/9, RPN2209, RPN2134, (Amersham manufactured for GE Healthcare by Lumigen Inc.

Reagenssit ECL-paketin sisällä:

Luminol/Enhancer Solution ja Stable Peroxide Buffer

Autoradiografian nesteet:

Developer (A) Ref. HT536 (1litre) ja Developer (B) Ref. HT536 (0,25litre), sekoitetaan yhdessä yhteen litraan veteen, joka tulee säiliöön 1 ja säiliöön 2 tulee Rapid fixer Ref. 2828Q.